

In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen
funktioneller Bereiche des Adenovirus Typ 5
E1B-55kDa-Proteins



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
- Biologie und Vorklinische Medizin -
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Thomas Zeller
aus Pilsting
Dezember 2003

Die vorliegende Arbeit wurde selbstständig
und ohne unzulässige Hilfe angefertigt.

Thomas Zeller

Promotionsgesuch eingereicht am: 16.12.2003

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Widmar Tanner und PD. Dr. Thomas Dobner

Prüfungsausschuss:	Prof. Dr. Günter Hauska (Vorsitzender)
	Prof. Dr. Widmar Tanner (1. Prüfer, Erstgutachten)
	PD Dr. Thomas Dobner (2. Prüfer, Zweitgutachten)
	Prof. Dr. Karl Kunzelmann (3. Prüfer)

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
---------------------------	----------

ABKÜRZUNGEN	VI
--------------------	-----------

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
----------	------------------------	----------

2	EINLEITUNG	3
----------	-------------------	----------

2.1	ADENOVIREN	3
------------	-------------------	----------

2.1.1	KLASSIFIKATION	3
-------	----------------	---

2.1.2	STRUKTUR UND GENOMORGANISATION	4
-------	--------------------------------	---

2.1.3	PRODUKTIVER INFEKTIONSZYKLUS	5
-------	------------------------------	---

2.1.4	FUNKTIONEN DES E1B-55kDa-PROTEINS IM PRODUKTIVEN INFEKTIONSZYKLUS	7
-------	---	---

2.2	TRANSFORMATION UND ONKOGENITÄT HUMANER ADENOVIREN	12
------------	--	-----------

2.2.1	ONKOGENES POTENZIAL HUMANER ADENOVIREN	13
-------	--	----

2.2.2	TRANSFORMATION VON NAGERZELLEN IN KULTUR	14
-------	--	----

2.2.3	TRANSFORMATION HUMANER ZELLEN IN KULTUR	14
-------	---	----

2.2.4	PERSISTENZ UND DNA-INTEGRATION	15
-------	--------------------------------	----

2.2.5	STRUKTUR UND FUNKTION ADENOVIRALER ONKOPROTEINE	16
-------	---	----

2.2.5.1	E1-Region	16
---------	-----------	----

2.2.5.2	E4-Region	18
---------	-----------	----

2.3	AUFGABENSTELLUNG	20
------------	-------------------------	-----------

3	MATERIAL	21
----------	-----------------	-----------

3.1	ZELLEN	21
------------	---------------	-----------

3.1.1	BAKTERIENSTÄMME	21
-------	-----------------	----

3.1.2	SÄUGERZELLEN	21
-------	--------------	----

3.2	ADENOVIREN	23
------------	-------------------	-----------

3.3	NUKLEINSÄUREN	24
------------	----------------------	-----------

3.3.1	OLIGONUKLEOTIDE	24
-------	-----------------	----

3.3.2	VEKTOREN	28
-------	----------	----

3.3.3	REKOMBINANTE PLASMIDE	28
3.4	ANTIKÖRPER	30
3.4.1	PRIMÄRANTIKÖRPER	30
3.4.2	SEKUNDÄRANTIKÖRPER	31
3.5	GRÖßEN- UND MOLEKULARGEWICHTSSTANDARDS	31
3.6	KOMMERZIELLE SYSTEME	32
3.7	TIERE	32
3.8	ENZYME UND REAGENZIEN	32
3.9	CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIAL	32
3.10	COMPUTERPROGRAMME UND DATENBANKEN	33
4	METHODEN	35
4.1	BAKTERIEN	35
4.1.1	KULTURBEDINGUNGEN UND LAGERUNG	35
4.1.2	TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i>	36
4.1.2.1	Rubidiumchlorid-Methode	36
4.1.2.2	Elektroporation	38
4.2	SÄUGERZELLEN	39
4.2.1	KULTURBEDINGUNGEN UND LAGERUNG VON SÄUGERZELLEN	39
4.2.1.1	Kultivierung von etablierten Säugerzellen als Einschichtkulturen	39
4.2.1.2	Gewinnung und Kultivierung primärer Rattennierenzellen	40
4.2.1.3	Lagerung von Säugerzellen	40
4.2.2	BESTIMMUNG DER GESAMT-ZELLZAHL	41
4.2.3	TRANSFEKTION VON SÄUGERZELLEN	41
4.2.3.1	Kalziumphosphat-Methode	41
4.2.3.2	GeneJammer®-Methode	42
4.2.4	TRANSFORMATION PRIMÄRER ZELLEN	43
4.2.5	ETABLIERUNG STABIL TRANSFORMIERTER ZELLINIEN	43
4.2.6	ERNTE VON SÄUGERZELLEN	44
4.3	ADENOVIREN	44
4.3.1	GEWINNUNG VON VIRUS AUS DNA	44
4.3.2	HERSTELLUNG UND LAGERUNG HOCHTITRIGER VIRUSSTOCKS	45
4.3.3	TITERBESTIMMUNG	46

4.3.4	INFEKTION MIT ADENOVIREN	48
4.3.5	BESTIMMUNG DER VIRUSREPLIKATION	48
4.3.6	ERMITTLUNG DER ANZAHL INFEKTIÖSER NACHKOMMENVIREN	49
4.4	DNA-TECHNIKEN	50
4.4.1	PRÄPARATION VON PLASMID-DNA AUS <i>E. COLI</i>	50
4.4.2	PRÄPARATION ADENOVIRALER DNA-BACMIDE AUS <i>E. COLI</i>	51
4.4.3	ISOLIERUNG ADENOVIRALER DNA AUS GEREINIGTEN VIRUSPARTIKELN	51
4.4.4	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN	52
4.4.5	DNA-AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	53
4.4.6	ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN	54
4.4.7	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	55
4.4.8	KLONIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN	56
4.4.8.1	Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme	56
4.4.8.2	Ligation und Transformation	57
4.4.8.3	Identifizierung rekombinanter Klone	57
4.4.9	DNA-SEQUENZIERUNG	57
4.5	PROTEIN-TECHNIKEN	58
4.5.1	GESAMTZELLEXTRAKT AUS SÄUGERZELLEN	58
4.5.2	IN-VIVO-PROTEINMARKIERUNG MIT [³⁵ S]-METHIONIN UND [³⁵ S]-CYSTEIN	58
4.5.3	QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON PROTEINKONZENTRATIONEN	60
4.5.4	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE	60
4.5.5	FÄRBUNG VON POLYACRYLAMIDGELEN	62
4.5.6	<i>WESTERN BLOT</i>	62
4.5.7	IMMUNPRÄZIPITATION	64
4.5.8	IMMUNFLUORESZENZ	66
4.5.8.1	Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA)	66
4.5.8.2	Fixierung mit Methanol	66
4.5.8.3	Immunologischer Nachweis	66
4.5.9	HERSTELLUNG EINES POLYKLONALEN ANTISERUMS GEGEN DIE SPÄTEN STRUKTURPROTEINE VON AD5	68
4.6	LUZIFERASE-VERSUCH	68

5	ERGEBNISSE	71
5.1	IDENTIFIZIERUNG FUNKTIONELL AKTIVER BEREICHE IM E1B-55kDa- PROTEIN DURCH MUTATIONSANALYSE	71
5.1.1	SEQUENZVERGLEICHE DER E1B-PROTEINE UNTERSCHIEDLICHER SEROTYPEN	71
5.1.2	KONSTRUKTION VON E1B-55kDa-MUTANTEN	74
5.1.3	ANALYSEN ZUM TRANSFORMIERENDEN POTENZIAL DER E1B-MUTANTEN	76
5.1.3.1	Untersuchung der Transformation in Kooperation mit E1A	76
5.1.3.2	Untersuchung der Transformation in Kooperation mit E1A und E4orf6	78
5.1.4	NACHWEIS VON E1A UND E1B IN STABIL TRANSFORMIERTEN ZELLINIEN	79
5.1.5	IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON E1B IN STABIL TRANSFORMIERTEN AB-ZELLINIEN	81
5.1.6	EINFLUSS DER MUTATIONEN AUF DIE INTERAKTION VON E1B-55kDa MIT p53	84
5.1.6.1	Reporter-Versuche zur E1B-vermittelten Repression der p53-abhängigen Transkriptionsaktivierung	84
5.1.6.2	E1B/E4orf6 vermittelte Destabilisierung von p53 in H1299-Zellen	86
5.1.7	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DER TRANSFORMATIONSVERSUCHE	88
5.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG GEZIELTER MUTATIONEN IM E1B-55kDa-PROTEIN IM KONTEXT DER VIRUSINFEKTION	90
5.2.1	KLONIERUNGSSYSTEM ZUR HERSTELLUNG PUNKTMUTierter ADENOVIREN	91
5.2.2	AUSWAHL INTERESSANTER E1B-POLYPEPTIDE	93
5.2.3	IMMUNOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER HERGESTELLTEN VIRUSMUTANTEN	95
5.2.4	DESTABILISIERUNG VON p53 IN VIRUSINFIZIERTEN ZELLEN	98
5.2.5	UNTERSUCHUNG DER VIRALEN DNA-SYNTHESE	99
5.2.6	HOST SHUT-OFF IN VIRUSINFIZIERTEN ZELLEN	101
5.2.7	PRODUKTION INFEKTIOSEr NACHKOMMENVIREN	103
5.2.8	IMMUNFLUORESZENZANALYSEN ZUR LOKALISATION UND INTERAKTION DER VERSCHIEDENEN E1B-MUTANTEN	104
5.2.8.1	Lokalisation von E1B-55kDa in infizierten A549-Zellen	105
5.2.8.2	Kolokalisation von E1B-55kDa mit E4orf3 und E4orf6	108
5.2.8.3	Kolokalisation von E1B-55kDa mit E2A-72kDa	113
5.2.8.4	Immunhistochemischer Nachweis der Lokalisation und Degradation von p53 in infizierten Zellen	115

5.2.8.5	Immunhistochemischer Nachweis der Umverteilung und Degradation von Mre11 in infizierten Zellen	117
5.2.9	ZUSAMMENFASSUNG DER INFEKTIONSVERSUCHE	120
6	<u>DISKUSSION</u>	121
6.1	BEITRAG POTENZIELLER STRUKTURLICHES IM E1B ZUR E1A-INDUZIERTEN TRANSFORMATION	121
6.1.1	BC-Box	123
6.1.2	RINGFINGER-MOTIV	125
6.2	EINFLUSS VON E1B WÄHREND DER PRODUKTIVEN INFEKTION	127
6.2.1	ETABLIERUNG EINES DIREKTEN KOLONISIERUNGSSYSTEMS FÜR AD5-VIRUSMUTANTEN	129
6.2.2	EFFEKTE VON MUTATIONEN IN DER BC-BOX ODER IM RINGFINGER-MOTIV	129
6.2.3	EFFEKTE DER MUTATIONEN IM PENDELMOTIV DES E1B	131
6.2.3.1	Subzelluläre Lokalisation von E1B-55kDa	131
6.2.3.2	Auswirkungen auf den produktiven Infektionszyklus	133
6.3	AUSBLICK	137
7	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	139

VERÖFFENTLICHUNGEN

DANKSAGUNG

Abkürzungen

Ad2, Ad5 usw.	Adenovirus Serotyp 2, 5 usw.
bid	bidest
Bp	Basenpaar
BRK-Zellen	Rattennierenzellen (<i>baby rat kidney cells</i>)
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleosid-5'-Triphosphate
E1, 2, 3, 4	frühe Region 1, 2, 3, 4 (<i>early region 1, 2, 3, 4</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EtOH	Ethanol
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
HA	Influenzavirus Hämagglutinin-Epitop
h.p.i.	Stunden nach Infektion (<i>hours post infection</i>)
HPV	Humanes Papilloma-Virus
kb	Kilobasen
kBp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
L1, 2, 3, 4, 5	späte Region 1, 2, 3, 4, 5 (<i>late region 1, 2, 3, 4, 5</i>)
MLP	<i>major late promotor</i>
MLTU	<i>major late transcription unit</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NES	nukleäres Exportsignal
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
orf	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PML	Protein der promyelozytischen Leukämie
POD	PML <i>oncogenic domain</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SKM	SUMO-Konjugationsmotiv
SUMO-1	<i>small ubiquitin-related modifier 1</i>
U	<i>unit</i> (Aktivitätseinheit von Enzymen)
UpM	Umdrehungen pro Minute
(v/v)	Volumeneinheit pro Gesamtvolumen (<i>volume per volume</i>)
Vol.	Volumeneinheit
wt	Wildtyp
(w/v)	Gewichtseinheit pro Gesamtvolumen (<i>weight per volume</i>)

1 Zusammenfassung

Das 55 kDa-Genprodukt der frühen Transkriptionseinheit 1B (E1B-55kDa) von Adenovirus Typ5 (Ad5) ist ein multifunktionelles Polypeptid, das in Kombination mit E1A die onkogene Transformation stimuliert und eine zentrale Rolle im lytischen Replikationszyklus von Ad5 einnimmt. Ad5 E1B-55kDa inhibiert dabei Vorgänge der zellulären Transkription, moduliert posttranskriptionell den Transport zellulärer und später viraler mRNAs, verändert die Kontrolle der zellulären und viralen Proteinbiosynthese im Zytoplasma und reguliert posttranslational die Stabilität des Tumorsuppressorproteins p53. Es wird vermutet, dass diese vielfältigen Aktivitäten über ein umfassendes Netzwerk unterschiedlicher Proteinwechselwirkungen und vor allem durch eine nukleozytoplasmatische Pendelfunktion des viralen Proteins vermittelt werden. Neueste Untersuchungen zeigen, dass die Pendelaktivität des 55 kDa-Genprodukts durch ein Kernexportsignal (NES) und ein eng benachbartes SUMO-Konjugationsmotiv (SKM) reguliert wird. Aminosäureaustausche in diesen Bereichen führen zum Verlust der Pendelaktivität in transfizierten und stabil transformierten Zelllinien und resultieren in einer nukleären bzw. zytoplasmatischen Akkumulation des viralen Proteins.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung des Pendelmotivs und anderer funktioneller Bereiche im E1B-55kDa durch gezielte Mutagenese hoch konservierter Aminosäuren im viralen Protein für den lytischen Infektionsverlauf von Ad5 untersucht. Dazu wurden Sequenzvergleiche der großen E1B-Polypeptide aller bekannten Adenovirusgruppen durchgeführt und zwei konservierte Sequenzmotive identifiziert. Es handelte sich dabei um ein potenzielles Ringfingermotiv und um eine konservierte BC-Box-Sequenz. Neun verschiedene Mutanten in diesen Bereichen wurden in Transformationsexperimenten auf ihr transformationsstimulierendes Potenzial, ihre Expression und subzelluläre Lokalisation und auf ihre Fähigkeit mit p53 zu interagieren, überprüft. Die erhaltenen Ergebnisse weisen auf eine funktionelle Bedeutung dieser Motive hin und konnten erstmals eine p53-unabhängige Aktivität von E1B während der Transformation nachweisen. Die interessantesten E1B-55kDa-Varianten sowie die Mutanten im E1B-Pendelmotiv wurden mit einem neu etablierten Klonierungssystem als Virusmutanten hergestellt. Im Anschluss wurde ihr Einfluss hinsichtlich der Virus-Ausbeute, der Effizienz der

viralen DNA-Synthese und der Produktion später viraler Strukturproteine analysiert. Die Phänotypisierung der Virusmutanten ergab überraschenderweise, dass keine der Mutationen einen negativen Einfluss auf die virale Replikation im Vergleich zum Ad5 Wildtypvirus H5dl309 hat.

In Übereinstimmung mit Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der veränderten E1B-Proteine in transient transfizierten und stabil transformierten Zellen zeigten Immunfluoreszenzstudien, dass Aminosäureaustausche im NES zu einer fast vollständigen Akkumulation des viralen Polypeptids im Zellkern führen. Die E1B-Proteine mit Mutationen im SKM oder an der potenziellen Ubc9-Bindestelle, einem Schlüsselenzym der SUMOylierungsreaktion, sind hingegen nahezu ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert. Doppelmutanten an den Stellen SKM/NES und Ubc9/NES zeigten in diesem Zusammenhang einen intermediären Phänotyp. Interessanterweise akkumuliert das E1B-NES-Protein im Zellkern in großen, kreisförmigen Strukturen, die den viralen Transkriptions- und Replikationszentren entsprechen. Zudem konnte ein Einfluss des potenziellen Ringfingermotivs auf die Lokalisation des E1B-55kDa-Proteins und die Integrität eines zellulären Kompartiments in infizierten Zellen nachgewiesen werden.

Insgesamt zeigen diese Arbeiten, dass Ad5 E1B-55kDa auch in virusinfizierten Zellen über ein NES und das SKM zwischen Kern und Zytoplasma pendelt. Dabei führen Mutationen in diesen Motiven zu einer dramatischen Umverteilung des E1B-Proteins. Die potenzielle Ubc9-Bindestelle ist ebenfalls an der Pendelfunktion des E1B-Proteins beteiligt. Aminosäureaustausche an dieser Stelle führen zu einem Phänotyp ähnlich dem der SKM-Mutanten. Mutationen im potenziellen Ringfinger-Motiv führen zur Desintegration des kernständigen *perinuclear body*. Trotz dieser deutlich veränderten Lokalisation der Mutanten im Pendelmotiv und im putativen Ringfingermotiv weisen die entsprechenden Virusmutanten keine erkennbaren Defekte im produktiven Infektionszyklus auf. Daher muss angenommen werden, dass die nukleozytoplasmatische Pendelaktivität und die Funktionen des putativen Ringfingermotivs des E1B-Proteins keine wichtige Rolle im lytischen Replikationszyklus von Ad5 in den getesteten Zelllinien spielen. Zudem besteht die Möglichkeit, dass Defekte durch andere virale Proteine kompensiert werden. Eine Beteiligung der Exportfunktion an der E1B-55kDa-vermittelten Destabilisierung von p53 ist jedoch anzunehmen.

2 Einleitung

2.1 Adenoviren

2.1.1 Klassifikation

Adenoviren wurden erstmals zu Beginn der fünfziger Jahre aus adenoidem Gewebe und dem Rachensekret respiratorisch erkrankter Personen isoliert (Rowe *et al.*, 1953; Hilleman und Werner, 1954). Nachdem die ersten Virusisolate als *adenoid degeneration* (AD), *respiratory illness* (RI), *adenoidal-pharyngeal-conjunctival* (APC) oder *acute respiratory disease* (ARD) bezeichnet wurden, fasste man sie später aufgrund gemeinsamer Merkmale und Eigenschaften zur Gruppe der Adenoviren zusammen (Huebner *et al.*, 1954; Enders *et al.*, 1956).

Die Familie der *Adenoviridae* umfasst derzeit über 100 verschiedene, serologisch unterscheidbare Virustypen, die wiederum in vier anerkannte Gattungen eingeteilt werden: zwei Gattungen (*Mastadenovirus* und *Aviadenovirus*) stammen aus Säugetieren bzw. aus Vögeln, die anderen beiden Gattungen (*Atadenovirus* und *Siadenovirus*) zeichnen sich durch ein breiteres Wirtsspektrum aus. Atadenoviren infizieren verschiedene Wiederkäuer, Vögel und Reptilien sowie ein Beuteltier und wurden auf Grund ihres hohen A+T-Gehalts benannt. Die zwei bekannten Siadenoviren wurden aus Vögeln und einem Frosch isoliert (zur Übersicht: Davison *et al.*, 2003, und enthaltene Literatur).

Basierend auf der Onkogenität im immunkompetenten Versuchstier und einer Reihe weiterer Kriterien (Hämagglutination, GC-Gehalt und Sequenzhomologien der viralen DNA) werden die 50 bis heute bekannten humanen Adenoviren in sechs Subgruppen (A-F) unterteilt (zur Übersicht: Graham, 1984; Shenk, 1996; Modrow und Falke, 1997). Humane Adenoviren sind weltweit mit hoher Prävalenz verbreitet und verursachen sowohl lytische als auch persistierende Infektionen. Obwohl sie hauptsächlich harmlose Erkrankungen auslösen, treten sie auch als Erreger von

schweren Krankheiten wie Keratokonjunktivitis, Pneumonie, Bronchitis, Gastroenteritis, Zystitis, persistierende Harnwegsinfektionen, Hepatitis und Meningoenzephalitis auf. In seltenen Fällen können Adenovirusinfektionen bei immunsupprimierten Personen auch zum Tode führen (zur Übersicht: Horwitz, 1996; Modrow und Falke, 1997).

2.1.2 Struktur und Genomorganisation

Die Mitglieder der Familie der *Adenoviridae* sind hüllenlose ikosaedrische Viren, die sich im Zellkern replizieren. Ihre linearen doppelsträngigen DNA-Genome sind 26 – 45 kBp groß und gelten damit als mittelgroße Vertreter der DNA-Viren. Die Genome sind durch invertierte terminale Sequenzwiederholungen (*inverted terminal repeat*, ITR) charakterisiert, die 36 – 200 bp lang sind und am 5' Ende mit einem terminalen Protein (TP) verknüpft vorliegen (zur Übersicht: Davison *et al.*, 2003). Ein charakteristisches Merkmal der Adenovirus-Kapside sind die antennenartigen Fortsätze (*spikes*), die an den 12 Ecken des Ikosaeders hervorragen (Abb. 1) und die Adsorption des Virus an den Rezeptor der Wirtszelle ermöglichen (Bergelson *et al.*, 1997).

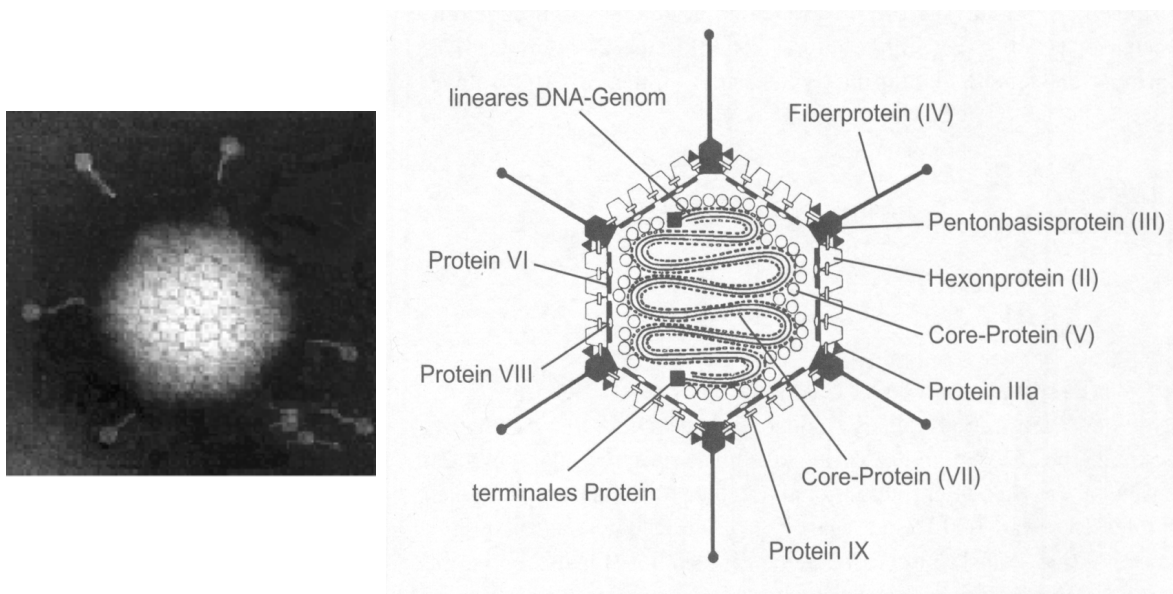


Abb. 1 Schematische Darstellung eines Adenovirus.

In der linken Abbildung ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Adenovirus dargestellt. Zu erkennen ist das ikosaedrische Kapsid mit den Fiberproteinen. Die rechte Darstellung zeigt einen schematischen Querschnitt durch das Adenovirus-Partikel (aus Modrow und Falke, 1997).

Zu den heute am ausführlichsten untersuchten humanen Adenoviren gehören die nah verwandten Serotypen 2 und 5 (Ad2 und Ad5) der Subgruppe C. Die Genome von Ad2 und Ad5 enthalten neun Transkriptionseinheiten (Abb. 2), die für etwa 40 verschiedene regulatorische und strukturelle Proteine und zwei virusassoziierte RNAs (VA RNAs) kodieren. Sequenzvergleiche mit anderen Serotypen zeigen, dass alle humanen Adenoviren eine ähnliche Genomorganisation besitzen und nahezu die gleichen Genprodukte exprimieren (zur Übersicht: Shenk, 1996).

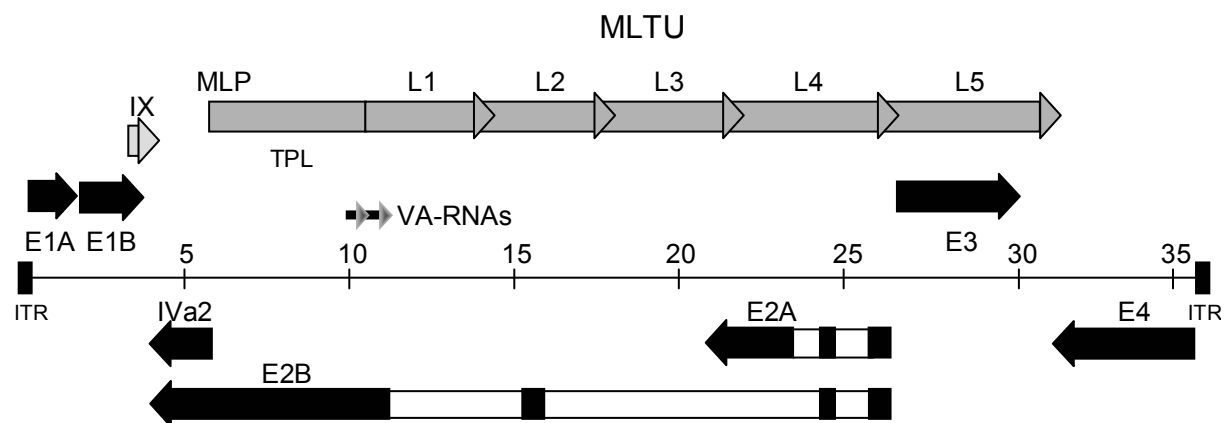


Abb. 2 Die Genomorganisation von Adenovirus Serotyp 5.

Dargestellt ist die Lage der frühen Gene (E1A, E1B, E2A/B, E3, E4, IX und IVa2) und der späten Transkriptionseinheit (MLTU). Die Pfeilrichtung gibt die Transkriptionsrichtung auf den beiden kodierenden DNA-Strängen des viralen Genoms an. Die späten Gene (L1 bis L5) werden erst nach dem Einsetzen der viralen DNA-Replikation von einem gemeinsamen Promotor (MLP) aus transkribiert und kodieren hauptsächlich für Strukturproteine des Virions. Die frühen viralen Transkriptionseinheiten sind bereits vor Beginn der DNA-Synthese aktiv und besitzen regulatorische Funktionen in Bezug auf DNA-Replikation (E2), Modulation des Immunsystems (E3) sowie Transkription, RNA-Prozessierung und Zellzyklus-Kontrolle (E1A/E1B und E4). Die Genprodukte der E1-, E3- und E4-Region sind unter den verschiedenen Vertretern der *Adenoviridae* nicht oder nicht in allen Gattungen konserviert. Diese Unterschiede der verschiedenen Gattungen werden als Anpassung an die jeweiligen Wirte verstanden (Davison *et al.*, 2003). MLTU: *major late transcription unit*; MLP: *major late promoter*; TPL: *tripartite leader*; VA RNAs: *virus-associated RNAs*; ITR: *inverted terminal repeat*.

2.1.3 Produktiver Infektionszyklus

Humane Adenoviren infizieren In-vivo ein großes Spektrum unterschiedlicher Zelltypen. Bevorzugte Zielzellen sind jedoch vor allem postmitotisch ruhende Epithelzellen des Hals-, Nasen-, Rachenraumes, der Lunge und des Verdauungs-

traktes. In Gewebekultur können Adenoviren in verschiedenen Tumorzelllinien und primären Zellen vermehrt werden. Während sie in vielen humanen Zellen einen produktiven (lytischen) Vermehrungszyklus durchlaufen, resultieren Infektionen von Zellen tierischen Ursprungs meist in einem abortiven Infektionsverlauf (zur Übersicht: Shenk, 1996; Modrow und Falke, 1997).

Der produktive Infektionszyklus wird in eine frühe und eine späte Phase unterteilt, die per Definition durch das Einsetzen der viralen DNA-Synthese getrennt sind. In der frühen Phase erfolgt nach Adsorption, Penetration und Kernimport des viralen DNA-Protein-Komplexes die Transkription und Translation bestimmter früher Gene. Dabei werden in einer zeitlich koordinierten Reihenfolge mehr als 20 regulatorische Proteine der frühen Transkriptionseinheiten E1A, E1B, E2, E3 und E4 exprimiert. Das Ziel der entsprechenden Genprodukte ist die Schaffung optimaler Bedingungen für die virale DNA-Synthese und die Produktion viraler Strukturproteine in der späten Phase der Infektion. Vor allem der Eintritt ruhender Zellen in die S-Phase und die Zellzyklusprogression durch die E1A- und E1B-Proteine ist für die virale Replikation essenziell, da den Viren nur in sich teilenden Zellen ein genügend großes Repertoire an Molekül-Bausteinen zur Verfügung steht. Die beiden E1B-Proteine (E1B-19kDa und E1B-55kDa) blockieren außerdem verschiedene antivirale Schutzmechanismen der Wirtszelle, wie z.B. Apoptose. Die frühe Transkriptionseinheit E2 kodiert für Proteine, die wichtige Funktionen bei der Replikation viraler DNA haben. Dazu gehören u.a. die viruseigene DNA-Polymerase, das DNA-bindende Protein (E2A-72kDa) und das terminale Protein (TP), das kovalent mit den 5'-Enden des Virusgenoms verknüpft ist (zur Übersicht: Shenk, 1996). Die Proteine der E3-Region besitzen hauptsächlich immunmodulatorische Funktionen, die das Erkennen und vorzeitige Eliminieren von virusinfizierten Zellen durch das Immunsystem des Wirtsorganismus verhindern (zur Übersicht: Gooding und Wold, 1990; Mathews und Shenk, 1991; Burgert und Blusch, 2000; Horwitz, 2001). Die E4-Region kodiert für mindestens sechs verschiedene Polypeptide, die durch alternatives Spleißen aus dem primären E4-Transkript entstehen und nach Anordnung des jeweiligen offenen Leserahmens als E4orf1, E4orf2, E4orf3, E4orf4, E4orf6 und E4orf6/7 bezeichnet

werden. Ein weiteres Protein könnte E4orf3/4 darstellen, das jedoch bisher in infizierten Zellen nicht nachgewiesen werden konnte. Die E4-Proteine besitzen vielfältige Funktionen, die für eine effiziente virale Replikation benötigt werden (zur Übersicht: Täuber und Dobner, 2001a).

Mit dem Einsetzen der viralen DNA-Replikation beginnt die späte Phase des lytischen Infektionszyklus. Sie ist gekennzeichnet durch die Aktivierung der späten Transkriptionseinheit (MLTU, *major late transcription unit*). Durch differenzielles Spleißen des Primärtranskripts entstehen fünf Gruppen verschieden langer mRNAs (L1 bis L5), die hauptsächlich für Strukturproteine des ikosaedrischen Kapsids kodieren. Diese mRNAs besitzen alle einen gemeinsamen 5'-nichtkodierenden Bereich, der als *tripartite leader* bezeichnet wird. Wesentlicher Bestandteil der späten Phase ist das Abschalten der zellulären Proteinsynthese (*host shut-off*), während virale mRNAs weiter translatiert werden. In Gewebekultur endet der produktive Replikationszyklus nach etwa 24 Stunden mit der Lyse der Wirtszelle, wobei je nach Serotyp bis zu 10.000 Viruspartikel produziert werden (zur Übersicht: Shenk, 1996; Modrow und Falke, 1997).

2.1.4 Funktionen des E1B-55kDa-Proteins im produktiven Infektionszyklus

Das Protein der frühen Transkriptionseinheit E1B ist ein multifunktionelles Phosphoprotein, das bei Ad5 aus 496 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von etwa E1B-55kDa besitzt. Während die Funktionen der meisten regulatorischen Genprodukte auf eine bestimmte Phase im lytischen Infektionszyklus beschränkt ist, werden die Eigenschaften des E1B-55kDa-Proteins sowohl in der frühen als auch in der späten Phase einer produktiven Virusinfektion benötigt. Untersuchungen der letzten Jahre haben ergeben, dass das E1B-Protein modulatorische Funktionen auf transkriptioneller, posttranskriptioneller, translationaler und posttranslationaler Ebene besitzt und somit für die Virusreplikation sehr wichtig ist.

In der frühen Phase der Infektion kann das E1B-55kDa-Protein das Tumorsuppressorprotein p53 binden und so dessen transaktivierende Funktion hemmen (Yew und Berk, 1992; Teodoro und Branton, 1997). Das p53-Protein wirkt als Transkriptionsfaktor, der die Genexpression sowohl aktivieren als auch reprimieren kann. Dies führt zu einer Arretierung des Zellwachstums bzw. zur Induktion von Apoptose (Ginsberg *et al.*, 1991; Farmer *et al.*, 1992; Martin und Berk, 1998). E1B-55kDa interagiert direkt mit der aminoterminalen Transaktivator-domäne von p53 und verhindert so die Wechselwirkung mit den Komponenten des RNA-Polymerase II-Präinitiationskomplexes, wie z.B. TBP, TAF_{II}31 oder TFIID, die für die Transkription p53-abhängiger Gene benötigt werden (Xiao *et al.*, 1994; Lu und Levine, 1995; Thut *et al.*, 1995). Neue Erkenntnisse lassen jedoch vermuten, dass E1B-55kDa eine aktive Rolle bei der Repression der p53-Transaktivierung spielt, da es selbst eine starke transkriptionsrepressorische Aktivität zeigt (Yew *et al.*, 1994; Martin und Berk, 1998). Das E1B-55kDa-Protein könnte die Transkription reprimieren, indem es Transkriptionsfaktoren hemmt oder an Veränderungen in der Chromatinstruktur beteiligt ist (Punga und Akusjarvi, 2000; Harada *et al.*, 2002).

In der späten Phase der Virusinfektion reguliert das E1B-55kDa-Protein im Verlauf des sog. *host shut-off* den Export viraler mRNA vom Kern ins Zytoplasma und die effiziente Synthese später viraler Genprodukte (zur Übersicht: Dobner und Kzhyshkowska, 2001). Das E1B-55kDa-Protein ist zusammen mit dem E4orf6-Protein (Sarnow *et al.*, 1984) für den bevorzugten nukleozytoplasmatischen Export viraler mRNA verantwortlich, während der Transport der meisten zellulären Transkripte inhibiert wird (Babich *et al.*, 1983; Babiss und Ginsberg, 1984; Babiss *et al.*, 1985; Pilder *et al.*, 1986). Der genaue Mechanismus dieses Transportvorgangs ist jedoch noch unklar. Der Einfluss des E1B-55kDa-E4orf6-Komplexes auf den mRNA-Transport scheint nach der Transkription und dem Prozessieren, aber vor dem Transport durch die Kernpore zu entstehen (Leppard und Shenk, 1989). Zudem ist der Export ungespleißter Transkripte stärker von E1B-55kDa abhängig als der Export kurzer und vollständig gespleißter mRNAs (Leppard, 1993). Die Selektivität des Transports ist zwar unabhängig von der Herkunft und Sequenz der RNA (Gaynor *et al.*, 1984;

Hearing und Shenk, 1985), wird aber durch das Vorhandensein eines *tripartite leaders* verbessert (Huang und Flint, 1998). Zusätzlich hängt der Kernexport wahrscheinlich mit einer Aktivierung der Transkription in der späten Phase der Infektion zusammen (Moore *et al.*, 1987; Leppard, 1993; Yang *et al.*, 1996).

Ornelles und Shenk beobachteten 1991, dass in virusinfizierten Zellen beim Fehlen von E4orf6 das E1B-55kDa-Protein nicht in die viralen Transkriptions- und Replikationszentren gelangt. Daraufhin schlugen sie ein Modell vor, das die Aktivierung des viralen und gleichzeitige Hemmung des zellulären mRNA-Transports zu erklären versucht: Der E1B-55kDa-E4orf6-Komplex bindet an einen zellulären RNA-Transkriptionsfaktor und bringt diesen in die viralen Zentren der Transkription und Replikation. Auf diese Weise verarmt die Zelle an diesem limitierenden Faktor und die zellulären mRNAs können nicht mehr transportiert werden (Ornelles und Shenk, 1991). Tatsächlich wurde das zelluläre Protein E1B-AP5 (E1B-assoziiertes Protein 5) identifiziert, das In-vitro und in virusinfizierten Zellen an das E1B-55kDa-Protein binden kann (Gabler *et al.*, 1998). E1B-AP5 ist ein nukleäres, RNA-bindendes Protein, das zur Familie der hnRNP-Proteine gehört, die an der Prozessierung von mRNA beteiligt sind und auch eine wichtige Rolle beim mRNA-Transport spielen (Izaurrealde und Mattaj, 1995). Die Interaktion von E1B-AP5 mit TAP, einem essenziellen RNA-Exportfaktor, machen die Beteiligung von E1B-AP5 an der viralen Replikation noch wahrscheinlicher (Bachi *et al.*, 2000).

Es ist derzeit immer noch nicht vollständig sicher, welches virale Protein des E1B-55kDa-E4orf6-Komplexes die aktive Rolle im nukleozytoplasmatischen Transport übernimmt. Zuerst wurde ein Modell vorgeschlagen, bei dem ein HIV-1 Rev-ähnliches Leucin-reiches nukleäres Exportsignal (NES) des E4orf6-Proteins den Kernexport vermittelt. Das Rev-Protein des Virus der menschlichen Immunschwächekrankheit (HIV-1; *human immunodeficiency virus type 1*) enthält ebenfalls ein NES und ist dadurch in der Lage unvollständig prozessierte virale mRNA vom Zellkern ins Zytoplasma infizierter Zellen zu transportieren. Außerdem enthält E4orf6 eine argininreiche amphipatische α -Helix, die für die Kernretention verantwortlich ist. E1B-55kDa besitzt diesem Modell zufolge keine eigene

Exportaktivität, sondern ermöglicht durch die Maskierung des Kernretentionssignals von E4orf6 den Export des Komplexes (Dobbelstein *et al.*, 1997; Weigel und Dobbelstein, 2000). Neuere Ergebnisse zeigen jedoch, dass das E1B-55kDa-Protein unabhängig von E4orf6 mit Hilfe eines eigenen aminoterminalen NES des HIV-1 Rev-Typs den Kernexport vermitteln kann (Krätzer *et al.*, 2000; Dosch *et al.*, 2001). Das E1B-55kDa-Protein enthält am Carboxyterminus ein mögliches Kernlokalisationssignal (*nuclear localization signal*; NLS), dessen genaue Lage jedoch noch unklar ist (Krätzer *et al.*, 2000). Zudem kann das E1B-55kDa-Protein durch kovalente Bindung von SUMO-1 (*small ubiquitin-related modifier 1*) modifiziert werden (Endter *et al.*, 2001). SUMO-1 gehört zur Familie der Ubiquitin-ähnlichen Proteine, die an eine Vielzahl zellulärer aber auch viraler Substratproteine angeheftet werden. Dies bewirkt hauptsächlich eine veränderte Affinität zu anderen Proteinen, was in vielen Fällen eine Veränderung der Lokalisation und/oder der Aktivität zur Folge hat (Melchior, 2000; Muller *et al.*, 2001; Wilson und Rangasamy, 2001; Pichler und Melchior, 2002). Endter und Mitarbeiter konnten zeigen, dass in Transfektionsstudien die SUMO-1-Modifikation des E1B-55kDa-Proteins sowohl für die nukleäre Akkumulation des viralen Proteins als auch für die Steuerung zu spezifischen Regionen innerhalb des Zellkerns essenziell ist. Daraus kann man schließen, dass die Konjugation von SUMO-1 zusammen mit dem nukleären Exportsignal an der nukleozytoplasmatischen Pendelaktivität des E1B-55kDa-Proteins beteiligt ist (Endter *et al.*, 2001).

Neben diesen posttranskriptionellen Funktionen ist das E1B-55kDa-Protein auch an der Kontrolle der Translation beteiligt. Dabei werden bevorzugt virale mRNAs translatiert, während die Translation zellulärer Transkripte inhibiert wird (Beltz und Flint, 1979). Diese Aktivität wird zwar durch die Hemmung des zellulären mRNA-Transports begünstigt, ist aber nicht von dieser abhängig (Moore *et al.*, 1987). Wesentlicher Bestandteil des Abschaltens der zellulären Proteinsynthese ist die Inaktivierung des Initiationsfaktors eIF-4F, der für die Translation von Transkripten mit einer 5'-Cap-Struktur erforderlich ist (Huang und Schneider, 1990). Normalerweise wird eIF-4F durch Phosphorylierung aktiviert, bindet an das 5'-Cap

von mRNAs und erleichtert so die Initiation der Translation. In der späten Phase der Adenovirusinfektion ist die Phosphorylierung von eIF-4F stark reduziert und es kann nur noch *Cap*-unabhängige Translation stattfinden. Virale Transkripte werden aufgrund der *tripartite leader*-Region unabhängig von eIF-4F weiter translatiert (Logan und Shenk, 1984; Dolph *et al.*, 1988; Dolph *et al.*, 1990). In Zellen, die mit einem E1B-defekten Virus infiziert wurden, bleibt der Initiationsfaktor eIF-4F phosphoryliert (Zhang *et al.*, 1994). Daraus kann man schließen, dass das E1B-55kDa-Protein an der Dephosphorylierung des eIF-4F und somit an der Regulation der Translation beteiligt ist, wobei die genaue Funktion noch unklar ist (Harada und Berk, 1999).

Das E1B-55kDa-Protein reguliert die zelluläre Genexpression auch auf post-translationaler Ebene, indem es zusammen mit E4orf6 den proteolytischen Abbau von p53 beschleunigt (Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997; Querido *et al.*, 1997; Steegenga *et al.*, 1998; Querido *et al.*, 2001a; Harada *et al.*, 2002). Sowohl E1B-55kDa als auch E4orf6 können unabhängig voneinander an p53 binden (Sarnow *et al.*, 1982a; Dobner *et al.*, 1996). Erst vor kurzem wurde der E1B-55kDa-E4orf6-Komplex als Untereinheit eines SCF-ähnlichen Komplexes (*Skp1*, *Cdc53/Cullin*, *F box receptor*) identifiziert, dessen Funktion die Ubiquitinylierung von Proteinen ist (Querido *et al.*, 2001b; Harada *et al.*, 2002). Es kann daraus abgeleitet werden, dass der E1B-55kDa-E4orf6-Komplex die Degradation von p53 über einen Ubiquitin- und Proteasomen-abhängigen Mechanismus steuert, wobei noch unklar ist, ob der Abbau an nukleären oder zytoplasmatischen Proteasomen stattfindet (Harada *et al.*, 2002).

In Abbildung 3 sind einige wichtige Funktionen des E1B-55kDa-Proteins gezeigt. Insgesamt spielt das E1B-55kDa-Protein eine sehr wichtige Rolle während des produktiven Infektionszyklus des humanen Ad5. Adenovirus-Mutanten, die kein funktionelles E1B-55kDa-Protein exprimieren, zeigen erhebliche Defekte bei der Synthese viraler Strukturproteine (Babiss *et al.*, 1985; Pilder *et al.*, 1986) und produzieren somit im Vergleich zum Wildtyp-Adenovirus deutlich weniger Nachkommenviren (Yew *et al.*, 1990).

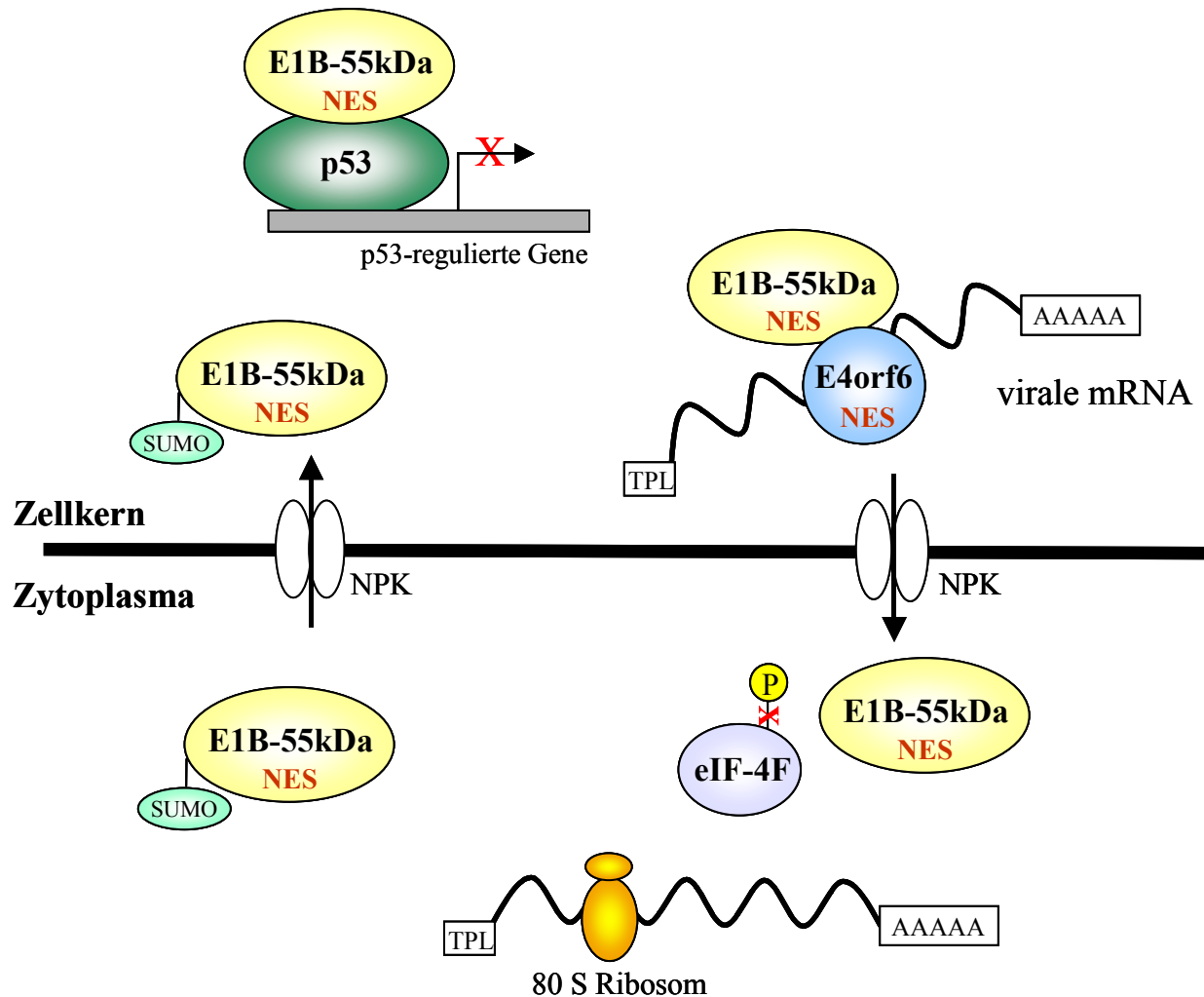


Abb. 3 Funktionen des E1B-55kDa-Proteins.

In der frühen Phase der Infektion bindet das E1B-55kDa-Protein im Zellkern an das Tumorsuppressorprotein p53 und hemmt so dessen transaktivierende Funktion. Im Komplex mit dem E4orf6-Protein kann das E1B-55kDa-Protein den selektiven Transport viraler mRNA vom Zellkern ins Zytoplasma bewirken. Im Zytoplasma verhindert das E1B-55kDa-Protein die Phosphorylierung des Initiationsfaktors eIF-4F, was dazu führt, dass nur noch *Cap*-unabhängige Translation stattfinden kann und somit vor allem virale Proteine gebildet werden. Der Rücktransport des E1B-55kDa-Proteins in den Zellkern wird durch die kovalente Verknüpfung mit SUMO-1 erleichtert. eIF-4F, eukaryotischer Initiationsfaktor 4F; NES, nukleäres Exportsignal; NPK, nukleärer Porenkomplex; TPL, *tripartite leader*.

2.2 Transformation und Onkogenität humaner Adenoviren

Die letzten 40 Jahre molekularbiologischer Untersuchungen an humanen Adenoviren haben sehr viel zum Verständnis der grundlegenden Prinzipien des normalen und malignen Zellwachstums beigetragen. Erste Beobachtungen des karzinogenen Potenzials humaner Adenoviren führten zu entscheidenden Einblicken in die

molekularen Mechanismen der Entstehung von Krebs und etablierten Adenoviren als Modellsystem zur Erklärung virusvermittelter Transformationsprozesse.

2.2.1 Onkogenes Potenzial humaner Adenoviren

Bis heute konnte kein Zusammenhang zwischen der Entstehung menschlicher Tumorerkrankungen und humanen Adenoviren hergestellt werden (Mackey *et al.*, 1976; Mackey *et al.*, 1979; Wold *et al.*, 1979; Chauvin *et al.*, 1990). Jedoch zeigten bereits 1962 Trentin und Mitarbeiter, dass das Adenovirus Serotyp 12 (Ad12) als erstes humanpathogenes Virus onkogene Eigenschaften in neugeborenen Hamstern aufweist (Trentin *et al.*, 1962). In weiteren Arbeiten konnte nur für bestimmte Serotypen (12, 18, 31) onkogenes Potenzial nachgewiesen werden (zur Übersicht: Graham, 1984). Verschiedene Serotypen wurden somit, abhängig von der Effizienz und Latenzzeit der Tumorinduktion, als nicht onkogen, schwach onkogen oder hochonkogen eingestuft (Tab. 1). Als hochonkogen gelten Viren, die mit sehr großer Effizienz und kurzer Latenzzeit Tumoren in Nagetieren induzieren. Virustypen werden hingegen als schwach onkogen eingestuft, wenn eine Tumorinduktion nur unregelmäßig und mit langen Inkubationszeiten beobachtet werden kann. Viren der Subgruppe D sind generell nicht onkogen. Einzige Ausnahme bilden die Serotypen 9 und 10, welche östrogenabhängige Mammakarzinome in weiblichen Ratten induzieren (Ankerst *et al.*, 1974b; Ankerst *et al.*, 1974a; Jonsson und Ankerst, 1977; Ankerst und Jonsson, 1989; Javier *et al.*, 1991).

ONKOGENITÄT IN TIEREN	SUBGRUPPE	SEROTYPEN	ART DES TUMORS
hochonkogen	A	12, 18, 31	undifferenzierte Sarkome
	D	9, 10	Fibroadenome
schwach onkogen	B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35	undifferenzierte Sarkome
nicht onkogen	C - F	C (1, 2, 5, 6); D (8, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49); E (4); F (40, 41)	Keine

Tab. 1 Übersicht hochonkogener, schwach und nicht onkogener Adenoviren

2.2.2 Transformation von Nagerzellen in Kultur

Ungeachtet ihres Potenzials, Tumoren in Nagetieren zu erzeugen, sind sowohl onkogene als auch nicht onkogene Adenoviren in der Lage, Zellen in Kultur zu transformieren. Dabei werden die transformierten Zellen morphologisch so verändert, dass sie als dichte und vielschichtige Kolonien (*Foci*) auswachsen und verschiedene phänotypische Merkmale onkogener Transformation aufweisen. Es können jedoch nicht alle dieser transformierten Zelllinien nach Inokulation in Nagetiere Tumoren erzeugen. Im Gegensatz zu Ad12-transformierten Zellen, die in syngen, immunkompetenten Ratten Tumoren bilden, können durch Ad2- oder Ad5-transformierte Rattenzellen keine Tumoren in Ratten erzeugen. Allerdings können Ad2-/Ad5- und Ad12-transformierte Zellen in thymusdefizienten Nacktmäusen, denen die MHC-Klasse I-restringierten zytotoxischen T-Zellen fehlen, Tumoren induzieren (Bernards *et al.*, 1983). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Tumorigenität von Adenovirus-transformierten Zellen hauptsächlich von den thymusabhängigen CTL-Komponenten des Immunsystems der Wirtstiere beeinflusst wird (Raska und Gallimore, 1982; Bernards *et al.*, 1983; Cook und Lewis, 1987). Neuen Daten zufolge muss die Möglichkeit in Erwägung gezogen werden, dass zusätzliche Mechanismen bestehen, die eine Tumorbildung durch Adenovirus-transformierte Zellen fördern. Diese werden durch die Expression von viralen Genprodukten beeinflusst, die in der E4-Region kodiert sind (zur Übersicht: Täuber und Dobner, 2001a).

2.2.3 Transformation humaner Zellen in Kultur

Trotz ihres onkogenen Potenzials in Tieren und ihrer Fähigkeit, primäre Nagerzellen in Kultur vollständig zu transformieren, konnte bisher kein Zusammenhang zwischen Adenoviren und der Tumorentstehung beim Menschen gefunden werden. Die Tatsache, dass viele Versuche humane Zellen in Kultur mit Adenovirus zu transformieren fehlschlagen, weist darauf hin, dass eine abortive Infektion einer der Faktoren ist, der mit einer hocheffizienten Transformation von nicht permissiven Nagerzellen assoziiert ist. Interessanterweise ist die Transformation humaner Zellen

mit nicht infektiösen, subgenomischen, viralen DNA-Fragmenten im Vergleich zu Nagerzellen ebenfalls außerordentlich ineffizient. Dies lässt darauf schließen, dass Permissivität keinen determinierenden Faktor für die Transformationseffizienz darstellt. Die molekularen Grundlagen, die dieser Beobachtung zugrunde liegen, sind jedoch noch weitgehend unbekannt, obwohl bereits einige Modelle diskutiert wurden (Shenk, 1996; Hutton *et al.*, 2000). Bis heute konnten nur wenige humane Zellen erfolgreich mit Ad12- oder Ad5-DNA-Fragmenten transformiert werden. Bei diesen Zellen handelt es sich im Allgemeinen um embryonale Zellen, wie z. B. humane embryonale Nierenzellen (HEK, *human embryonal kidney cells*) (Graham *et al.*, 1977; Whittaker *et al.*, 1984), humane embryonale Lungenzellen (HEL, *human embryonal lung cells*) (van den Heuvel *et al.*, 1992), humane embryonale Retinoblasten (HER, *human embryonal retinoblasts*) (Byrd *et al.*, 1982; Gallimore *et al.*, 1986; Fallaux *et al.*, 1996; Fallaux *et al.*, 1998) und Amniozyten (Schiedner *et al.*, 2000). Reproduzierbar, wenn auch weniger effizient als Nagerzellen, lassen sich jedoch nur humane, embryonale Retinoblasten und Amniozyten transformieren.

2.2.4 Persistenz und DNA-Integration

Die meisten Adenovirus-induzierten Tumoren, Tumorzelllinien und transformierten Zellklone zeichnen sich durch die Persistenz der viralen DNA über chromosomale Integration und die Expression von virusspezifischen Antigenen aus. Dementsprechend folgt die adenovirale Transformation dem klassischen Konzept der viralen Onkogenese, welche auf der Persistenz der viralen Gene in transformierten Zellen beruht (zur Übersicht: Graham, 1984). Allerdings wurde in Einzelfällen beobachtet, dass die ständige Anwesenheit und Expression adenoviraler Sequenzen nicht unbedingt für die Aufrechterhaltung des onkogenen Phänotyps verantwortlich ist (Paraskeva und Gallimore, 1980; Kuhlmann *et al.*, 1982; Paraskeva *et al.*, 1982; Pfeffer *et al.*, 1999). Während die Mehrzahl der durch Ad9 und Ad12 entstandenen Tumorzellen eine oder mehrere Kopien des viralen Genoms enthalten (Brusca *et al.*, 1984; Graham, 1984; Javier *et al.*, 1991), findet man in den meisten Nagerzellen, die durch Ad2 oder Ad5 transformiert wurden, nur Teile des viralen Genoms (Graham, 1984). Dabei enthalten alle onkogen transformierten Zellen

konsistent das linke Ende des viralen Genoms mit der E1-Region (zur Übersicht: Tooze, 1981; Graham, 1984). Ebenso können in den meisten transformierten Zelllinien, die nach Transfektion rekombinanter Plasmide etabliert wurden, kodierende Sequenzen für die E1A- und E1B-Onkogene in integrierter Form nachgewiesen werden. Aufgrund der Tatsache, dass einzig die E1-Region in virustransformierten Zellen konsistent integriert und allein die Transfektion von Zellen in Kultur mit den E1-Genen zu einer onkogenen Transformation führt, ist anzunehmen, dass die E1-Genprodukte die Initiation der Transformation vermitteln und Funktionen besitzen, die zur Aufrechterhaltung einiger phänotypischer Merkmale transformierter Zellen benötigt werden. Einzige Ausnahme stellt Ad9 der Subgruppe D dar, dessen alleinige onkogene Determinante in der frühen Region 4 kodiert wird (Javier *et al.*, 1992). Letzten Ergebnissen zufolge liegt auch das onkogene Potenzial der Subgruppe A- und C-Adenoviren nicht ausschließlich in der E1-Region. Eine neue Rolle kommt hier den Genprodukten der E4-Region zu (zur Übersicht: Täuber und Dobner, 2001a; Täuber und Dobner, 2001b).

2.2.5 Struktur und Funktion adenoviraler Onkoproteine

2.2.5.1 E1-Region

Es ist mittlerweile anerkannte wissenschaftliche Meinung, dass es sich bei der Transformation durch Adenoviren um einen vielstufigen Prozess handelt, an dem mehrere Proteine der E1-Region beteiligt sind. Zudem gibt es eine Vielzahl von Hinweisen, dass alternative oder zusätzliche Mechanismen an der Adenovirus-vermittelten onkogenen Transformation beteiligt sind. Dabei werden insbesondere eine Beteiligung der Genprodukte der E4-Region als auch epigenetische Änderungen infolge der viralen DNA-Integration diskutiert.

Das onkogene Potenzial humaner Adenoviren wird traditionell der E1-Region zugeschrieben, die am linken Ende des adenoviralen Genoms lokalisiert ist (siehe Abb. 2). Diese Region kodiert für die Genprodukte der E1A- und E1B-Transkriptionseinheiten und ist für eine vollständige morphologische

Transformation ausreichend (zur Übersicht: Bernards und van der Eb, 1984; Graham, 1984; Shenk, 1996). Dahingegen wird eine Immortalisierung von Nagerzellen allein durch die E1A-Genprodukte herbeigeführt (Houweling *et al.*, 1980). Die E1A-Transkriptionseinheit kodiert für zwei nukleäre, multifunktionelle Phosphoproteine (E1A 12S und E1A 13S), welche den proliferativen Status von Zellen beeinflussen können. Beide E1A-Proteine sind in der Lage, Zellen zu immortalisieren, die Zellzyklusbarrieren aufzuheben und, zusammen mit anderen viralen oder zellulären Onkogenen, Zellen zu transformieren. Diese Funktionen werden durch Interaktionen mit wachstumsinhibitorischen und genregulatorischen Proteinen vermittelt (zur Übersicht: Russell, 2000).

Neben den transformierenden Eigenschaften besitzen die E1A-Genprodukte auch die Fähigkeit Apoptose einzuleiten, indem sie die Akkumulation und Aktivierung des zellulären Tumorsuppressors p53 induzieren (zur Übersicht: White, 1995; Chinnadurai, 1998; White, 1998). Jedoch ist E1A auch in der Lage p53-unabhängige Apoptosewege zu aktivieren (Teodoro *et al.*, 1995; Marcellus *et al.*, 1996).

Zur vollständigen morphologischen Transformation primärer Zellen sind zusätzlich zu den E1A-Genprodukten auch die E1B-Proteine notwendig. Die E1B-Transkriptionseinheit von Ad5 kodiert für zwei Onkoproteine, E1B-55kDa und E1B-19kDa. Beide Proteine transformieren in Kooperation mit E1A primäre Nagerzellen, wobei sie unabhängig voneinander, jedoch additiv wirken (Gallimore *et al.*, 1985; McLorie *et al.*, 1991). Dabei spielt die Funktion beider E1B-Proteine eine Rolle, auf unterschiedlichen Wegen den E1A-induzierten Zelltod zu blockieren (zur Übersicht: Chinnadurai, 1998; White, 1998). Das E1B-19kDa-Protein ist dem zellulären Proto-Onkogen Bcl-2 funktionell ähnlich und interagiert mit den Apoptoseregulatoren Bax und CED4. Obwohl E1B-19kDa nicht an p53 bindet, kann es über einen noch unbekannten Mechanismus die p53-induzierte Transrepression aufheben, die über den Carboxyterminus des Tumorsuppressorproteins vermittelt wird. Im Gegensatz dazu interagiert E1B-55kDa direkt mit der aminoterminalen Domäne von p53 und inhibiert über seine intrinsische Repressorfunktion die Transaktivierung p53-regulierter Gene (zur Übersicht: White, 1996).

2.2.5.2 E4-Region

Nachdem man lange Zeit das transformierende Potenzial von Adenoviren einzig auf die E1-Region zurückführte, kann nun auch der E4-Region eine wichtige Funktion im Transformationsprozess zugeordnet werden. Daten der letzten Jahre zeigen, dass die Proteine der E4-Region ein weites Spektrum an Funktionen umfassen, die für eine effiziente virale Replikation benötigt werden. Dabei agieren die E4-Proteine über ein komplexes Netzwerk aus Protein-Protein-Interaktionen mit zellulären Faktoren, die in Transkription, Apoptose, Zellzykluskontrolle, DNA-Reparaturmechanismen, Signalübertragung, posttranslationalen Modifikationen und der Erhaltung der Integrität von PML *oncogenic domains* (PODs) involviert sind. Nach heutigem Kenntnisstand überlappen einige der lytischen Funktionen mit denen, welche für die onkogene Transformation primärer Säugerzellen verantwortlich sind (zur Übersicht: Täuber und Dobner, 2001a).

In den letzten Jahren fanden in Bezug auf Transformation und Onkogenität die beiden E4-Genprodukte E4orf3 und E4orf6 zunehmende Beachtung. Sie modulieren die Kontrollmechanismen der Wirtszelle im produktiven Infektionszyklus auf allen Ebenen der Genexpression. Dabei zeigen beide Proteine zum Teil funktionelle Überlappungen. Jedes der Genprodukte hat voneinander unabhängige Funktionen bezüglich der viralen DNA-Replikation, der späten viralen Proteinsynthese, dem Abschalten der Wirtszell-Proteinsynthese und der Produktion von Nachkommen-viren. Ebenso inhibieren sie eine Konkatemerbildung des viralen Genoms (Halbert *et al.*, 1985; Bridge und Ketner, 1989; Huang und Hearing, 1989; Bridge und Ketner, 1990; Weiden und Ginsberg, 1994). Einige der redundanten Funktionen beruhen auf der Fähigkeit, mit den gleichen viralen und zellulären Faktoren zu interagieren. Sowohl E4orf3 als auch E4orf6 binden an E1B-55kDa (Sarnow *et al.*, 1984; Rubenwolf *et al.*, 1997; Leppard und Everett, 1999; Nevels *et al.*, 1999a) und an die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK), einem Schlüsselenzym in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (Boyer *et al.*, 1999). Es wird diskutiert, dass die Komplexbildung mit DNA-PK die Entstehung konkatemerer,

viraler Genome verhindert (Weiden und Ginsberg, 1994; Boyer *et al.*, 1999; Nicolas *et al.*, 2000).

Es konnte mittlerweile sowohl für Ad5 E4orf6 als auch für Ad5 E4orf3 ein transformierendes und onkogenes Potenzial gezeigt werden. In Kooperation mit den Proteinen der E1-Region sind beide E4-Genprodukte in der Lage die *Focus*-Bildung von primären Rattennierenzellen zu verstärken (Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997; Nevels *et al.*, 1999a; Nevels *et al.*, 1999b). Zellen, die stabil E1A, E1B, E4orf3 und/oder E4orf6 exprimieren, besitzen viele zusätzliche Eigenschaften, die mit einer vollständigen onkogenen Transformation im Zusammenhang stehen. Diese schließen vor allem grundlegende morphologische Veränderungen und, insbesondere bezüglich E4orf6, auch ein dramatisch erhöhtes Tumorstadium in Nacktmäusen mit ein (Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1999a; Nevels *et al.*, 1999b).

Dabei liegen den onkogenen Aktivitäten von E4orf6 unterschiedliche Wirkmechanismen zugrunde. Die hochgradig transformierten, E4orf6-assoziierten Phänotypen korrelieren mit einer dramatischen Reduktion der p53-Mengen. Diese korrelieren wiederum invers mit der E4orf6-Expression (Nevels *et al.*, 1999a). Anscheinend wirken E4orf6 und E1B-55kDa kooperativ der E1A-induzierten Stabilisierung von p53 entgegen, indem p53 verstärkt dem proteasomalen Abbau zugeführt wird (Grand *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997; Querido *et al.*, 1997; Roth *et al.*, 1998; Steegenga *et al.*, 1998; Nevels *et al.*, 1999a; Boyer und Ketner, 2000; Cathomen und Weitzman, 2000; Wienzek *et al.*, 2000). Obwohl p53 sowohl an die amino- als auch carboxyterminale Domäne des E4orf6-Proteins bindet (Querido *et al.*, 2001a), ist für eine Transformation nur der Carboxyterminus von E4orf6 notwendig. Diese Effekte sind unabhängig von der p53-Stabilität, umfassen jedoch andere Interaktionen mit dem Tumorsuppressor (Dobner *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997; Querido *et al.*, 1997).

Die Fähigkeit von E4orf3 Zellen onkogen zu transformieren ist im Gegensatz zu E4orf6 nicht mit der Funktion und Stabilität von p53 assoziiert. Vermutlich beruhen diese Effekte auf der Interaktion mit dem E1B-55kDa-Protein (König *et al.*, 1999;

Leppard und Everett, 1999) und der Koloalisation mit den PODs (Nevels *et al.*, 1999b). Es konnte jedoch bisher keine Interaktion mit dem PML-Genprodukt, dem Markerprotein der PODs, nachgewiesen werden (Nevels *et al.*, 1999b).

2.3 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeiten sollten durch Mutagenese hoch konservierter Aminosäuren im E1B-55kDa-Protein von Ad5 funktionell wichtige Domänen im viralen Polypeptid identifiziert und in Bezug auf ihr transformationsstimulierendes Potenzial, ihre intrazelluläre Lokalisation, Expression und Interaktion mit dem Tumorsuppressor p53 in transformierten BRK-Zellen untersucht werden. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse sollten im nächsten Schritt diese Bereiche und die für die Pendelfunktion des E1B-Proteins wichtigen Regionen (nukleäres Exportsignal, SUMO-Konjugationsmotiv) im viralen Kontext charakterisiert werden. Ziel dieser Untersuchungen war es, den Einfluss der Mutationen auf die virale Replikation in lytisch infizierten Zellen zu bestimmen. Die Virusmutanten sollten dazu hinsichtlich der Expression der E1B-Proteine, der Virus-Ausbeute, der Effizienz der viralen DNA-Synthese und der Produktion später viraler Strukturproteine in verschiedenen Zelllinien analysiert werden. Weiterhin sollte durch immunhistochemische Untersuchungen die subzelluläre Lokalisation der veränderten E1B-55kDa-Proteine und ihre Interaktion mit anderen viralen und zellulären Proteinen in virusinfizierten Zellen bestimmt werden. Insgesamt sollten diese Arbeiten zu neuen Erkenntnissen führen, die zur Adenovirus-vermittelten Transformation primärer Zellen beitragen und gleichzeitig das Verständnis über die Rolle des E1B-55kDa-Proteins in der Regulation des produktiven Infektionszyklus humaner Adenoviren erweitern.

3 Material

3.1 Zellen

3.1.1 Bakterienstämme

Zur Klonierung rekombinanter DNA und Amplifikation von Plasmiden wurden die *E. coli* Stämme DH5 α , DH10B und SURE® (Stratagene) verwendet. Bei der QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis kamen XL1-Blue (Stratagene) zum Einsatz. Die Klonierung mutierter Adenovirus-Genome wurde im Stamm XL2-Blue (Stratagene) durchgeführt.

BEZEICHNUNG	GENOTYP
DH5 α	<i>supE44, ΔlacU169, (ϕ80dlacZΔM15), <i>hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i> (Hanahan, 1983).</i>
DH10B	<i>F'araD139, Δ(ara, leu)7697, ΔlacX174, galU, galK, mcrA, Δ(mrr-, <i>hsdR</i>-, mcrBC), <i>rspL, deoR, (ϕ80dlacZΔM15), endA1, nup5, recA1</i> (Bethesda Research Laboratories).</i>
SURE®	<i>e14-(McrA-), Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr) 171, endA1, supE44, thi-1, gyrA96, relA1, lac, recB, recJ, sbcC, umuC::Tn5(Kan^r), uvrC, [F'proAB, lacI^qZΔM15, Tn10 (Tet^r)]</i> (Greener, 1990).
XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F'proAB, lacI^qZΔM15, Tn10 (Tet^r)]</i> (Bullock <i>et al.</i> , 1987).
XL2-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F'proAB, lacI^qZΔM15, Tn10 (Tet^r), Amy, Cam^r]</i> (Bullock <i>et al.</i> , 1987; Greener und Jerpseth, 1993).

3.1.2 Säugerzellen

BEZEICHNUNG	MERKMAL
911	Adenovirus Typ 5-transformierte, humane, embryonale Retinoblastom-zelllinie. Die E1-Region ist stabil im Genom integriert und exprimiert die adenoviralen E1A- und E1B-Genprodukte (Graham <i>et al.</i> , 1977).
A549	Zellen eines humanen Lungenkarzinoms, Wildtyp p53 (Giard <i>et al.</i> , 1973).

BEZEICHNUNG	MERKMAL
Amniozyten	Primäre humane Amniozyten.
BRK	Primäre Nierenzellen aus 3-5 Tage alten Sprague-Dawley-Ratten.
H1299	Humane, p53-negative Zelllinie aus einem Lungenkarzinom (Mitsudomi <i>et al.</i> , 1992).
HeLa	Zelllinie aus einem HPV18-positiven menschlichen Gebärmutterhalskarzinom, Wildtyp p53 (Gey <i>et al.</i> , 1952).
MCF7	Humane Mammakarzinom-Zelllinie, Überexpression von mdm2, Wildtyp p53 (Soule <i>et al.</i> , 1973).
A5 / A6	Etablierte Rattenzelllinie transformiert mit E1A (12S und 13S) (diese Arbeit).
AB51 / AB52	Etablierte Rattenzelllinie transformiert mit E1A (12S und 13S) sowie wt E1B-55kDa (diese Arbeit).
AB53 / AB55	Etablierte Rattenzelllinie transformiert mit E1A (12S und 13S) sowie L180PC184F E1B-55kDa (diese Arbeit).
AB56	Etablierte Rattenzelllinie transformiert mit E1A (12S und 13S) sowie L180AC184S E1B-55kDa (diese Arbeit).
AB57 / AB58	Etablierte Rattenzelllinie transformiert mit E1A (12S und 13S) sowie C184T E1B-55kDa (diese Arbeit).
AB59 / AB60	Etablierte Rattenzelllinie transformiert mit E1A (12S und 13S) sowie C283SC288S E1B-55kDa (diese Arbeit).
AB61 / AB62	Etablierte Rattenzelllinie transformiert mit E1A (12S und 13S) sowie H344LC348S E1B-55kDa (diese Arbeit).
AB63 / AB64	Etablierte Rattenzelllinie transformiert mit E1A (12S und 13S) sowie C361S E1B-55kDa (diese Arbeit).
AB67 / AB68	Etablierte Rattenzelllinie transformiert mit E1A (12S und 13S) sowie H373LH377L E1B-55kDa (diese Arbeit).
AB69 / AB70	Etablierte Rattenzelllinie transformiert mit E1A (12S und 13S) sowie C393SH396L E1B-55kDa (diese Arbeit).
AB71 / AB72	Etablierte Rattenzelllinie transformiert mit E1A (12S und 13S) sowie C454SC456S E1B-55kDa (diese Arbeit).
ABS60 / ABS61	Etablierte Rattenzelllinie transformiert mit E1A (12S und 13S), E4orf6 und wt E1B-55kDa (diese Arbeit).
ABS62 / ABS63	Etablierte Rattenzelllinie transformiert mit E1A (12S und 13S), E4orf6 und C184T E1B-55kDa (diese Arbeit).
ABS64 / ABS65	Etablierte Rattenzelllinie transformiert mit E1A (12S und 13S), E4orf6 und C393SH396L E1B-55kDa (diese Arbeit).

BEZEICHNUNG	MERKMAL
ABS66 / ABS67	Etablierte Rattenzelllinie transformiert mit E1A (12S und 13S), E4orf6 und C454SC456S E1B-55kDa (diese Arbeit).
ABS71	Etablierte Rattenzelllinie transformiert mit E1A (12S und 13S), E4orf6 und L180PC184F E1B-55kDa (diese Arbeit).
ABS73	Etablierte Rattenzelllinie transformiert mit E1A (12S und 13S), E4orf6 und H373LH377L E1B-55kDa (diese Arbeit).
ABS74 / ABS75	Etablierte Rattenzelllinie transformiert mit E1A (12S und 13S), E4orf6 und H344LC348S E1B-55kDa (diese Arbeit).
ABS76	Etablierte Rattenzelllinie transformiert mit E1A (12S und 13S), E4orf6 und L180AC184S E1B-55kDa (diese Arbeit).
ABS77	Etablierte Rattenzelllinie transformiert mit E1A (12S und 13S), E4orf6 und C361S E1B-55kDa (diese Arbeit).
ABS78 / ABS79	Etablierte Rattenzelllinie transformiert mit E1A (12S und 13S), E4orf6 und C283SC288S E1B-55kDa (diese Arbeit).

3.2 Adenoviren

BEZEICHNUNG	MERKMAL
H5dl309	Wildtyp Ad5 mit einer 1863 Bp langen Deletion (nt 28602 bis 30465 Bp) des E3-Leserahmens (Jones und Shenk, 1979).
H5dl1520	E1B-55kDa Mutante mit einer 827 Bp langen Deletion (nt 2496 bis 3323) und einem Stoppkodon an Position 2025 im dl309 Rückgrat (Barker und Berk, 1987).
H5pg4100	Wildtyp Ad5 mit einer 1863 Bp langen Deletion (nt 28602 bis 30465 Bp) des E3-Leserahmens (unveröffentlichte Daten Peter Groitl).
H5pm4101	E1B-55kDa Mutante mit drei Punktmutationen an den Positionen 83, 87 und 91 (L83A, L87A und L91A) im pg4100 Rückgrat (diese Arbeit).
H5pm4102	E1B-55kDa Mutante mit einer Punktmutation an Position 104 (K104R) im pg4100 Rückgrat (diese Arbeit).
H5pm4103	E1B-55kDa Mutante mit Punktmutationen an den Positionen 83, 87, 91 und 104 (L83A, L87A, L91A und K104R) im pg4100 Rückgrat (diese Arbeit).
H5pm4104	E1B-55kDa Mutante mit einer Punktmutation an Position 103 (V103D) im pg4100 Rückgrat (diese Arbeit).
H5pm4105	E1B-55kDa Mutante mit Punktmutation an den Positionen 100 und 101 (L100P und K101A) im pg4100 Rückgrat (diese Arbeit).

BEZEICHNUNG	MERKMAL
H5pm4106	E1B-55kDa Mutante mit Punktmutation an den Positionen 83, 87, 91, 100 und 101 (L83A, L87A, L91A, L100P und K101A) im <i>pg4100</i> Rückgrat (diese Arbeit).
H5pm 4124	E1B-55kDa Mutante mit einer Punktmutation an Position 184 (C184T) im <i>pg4100</i> Rückgrat (diese Arbeit).
H5pm 4125	E1B-55kDa Mutante mit Punktmutationen an den Positionen 180 und 184 (L180A und C184S) im <i>pg4100</i> Rückgrat (diese Arbeit).
H5pm 4126	E1B-55kDa Mutante mit Punktmutationen an den Positionen 373 und 377 (H373L und H377L) im <i>pg4100</i> Rückgrat (diese Arbeit).
H5pm 4127	E1B-55kDa Mutante mit Punktmutationen an den Positionen 454 und 456 (C454S und C456S) im <i>pg4100</i> Rückgrat (diese Arbeit).

3.3 Nukleinsäuren

3.3.1 Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden als Startermoleküle für Sequenzreaktionen, PCR-Amplifikationen und die Einführung von Mutationen durch PCR verwendet. Sie wurden von der Firma Metabion bezogen. In der ersten Spalte ist die Nummer des Oligonukleotids in der *Filemaker Pro*-Datenbank der Arbeitsgruppe angegeben.

#	Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
64	E1Bfw bp2043 fw	CGC GGG ATC CAT GGA GCG AAG AAA CCC ATC TGA GC	sequenzieren Ad5 viral. Replikation
110	E1B 361-389 rev :24	CGG TGT CTG GTC ATT AAG CTA AAA	viral. Replikation
330	E1A fw bp 626 fw	CCG AAG AAA TGG CCG CCA GTC TTT TGG ACC AGC	sequenzieren Ad5
331	E1A rev bp 1290 rev	GCG TCT CAG GAT AGC AGG CGC CAT TTT AGG ACG G	sequenzieren Ad5
332	E1A 13S bp1073 rev	GCC ACA GGT CCT CAT ATA GCA AAG CG	sequenzieren Ad5
543	Ad5 3670 rev	CTG ACG CAC CCC GGC CC	sequenzieren Ad5
544	Ad5 10340 fw	CCG CAC CAG GTA CTG G	sequenzieren Ad5
545	Ad5 27890 fw	GAG GCA GAG CAA CTG CGC C	sequenzieren Ad5
546	Ad5 32730 fw	GGG ACT GGT CTG GCC AC	sequenzieren Ad5

#	BEZEICHNUNG	SEQUENZ	VERWENDUNG
547	Ad5 35780 fw	CCC ACG TTA CGT AAC TTC CC	sequenzieren Ad5
592	E1B55-SUfw-324	CTA AAG GGG GTA AGG AGG GAG CGG GGG	Mutagenese von E1B-55kDa
593	E1B55-SUrev-300	CCC CCG CTC CCT CCT TAC CCC CTT TAG	Mutagenese von E1B-55kDa
594	E1B55-NESfw-284	GTG GCT GAA GCG TAT CCA GAA GCG AGA CGC ATT GCG ACA ATT ACA	Mutagenese von E1B-55kDa
595	E1B55-NESrev-240	TGT AAT TGT CGC AAT GCG TCT CGC TTC TGG ATA CGC TTC AGC CAC	Mutagenese von E1B-55kDa
702	fw-Ubc9-288	GGG CAG GGG CCA GCG GGG GTA AAG AGG	Mutagenese von E1B-55kDa
703	rev-Ubc9-288	CCT CTT TAC CCC CGC TGG CCC CTG CCC	Mutagenese von E1B-55kDa
765	E4orf3f bp 32918 rev	CCC TGC GAA GGG ACC TAC G	sequenzieren Ad5
766	Abra. seq. rev bp 3604	CGA GTT GGT GCT CAT GGC GG	sequenzieren Ad5
768	e4orf3f bp 32918 rev	CCC TGC GAA GGG ACC TAC G	sequenzieren Ad5
780	Seq E1-Box fw 1251 bp	GTC CTG TGT CTG AAC CTG AGC	sequenzieren Ad5
781	Seq E1-Box fw 1582 bp	GAT TGC GTG TGT GGT TAA CGC	sequenzieren Ad5
782	Seq E1-Box fw 2454 bp	CAA GGA TAA TTG CGC TAA TGA GC	sequenzieren Ad5
783	Seq E1-Box rev 3373 bp	CCA CAC TCG CAG GGT CTG C	sequenzieren Ad5
784	Seq E1-Box fw 3626 bp	CGC CAT GAG CAC CAA CTC G	sequenzieren Ad5
785	Seq E1-Box fw 4799 bp	CAC GCT TTG AGT TCA GAT GG	sequenzieren Ad5
786	Seq E1-Box fw 5310 bp	CAG GGT CAT GTC TTT CCA CG	sequenzieren Ad5
787	Seq E1-Box fw 5737 bp	CAT GAG CCG GTG TCC ACG C	sequenzieren Ad5
788	Seq E1-Box fw 7719 bp	CCA TCC AGC CTC GCG TCG	sequenzieren Ad5
789	fwd-E1B-V103D	GCT AAA GGG GGA TAA GAG GGA GC	Mutagenese von E1B-55kDa
790	rev-E1B-V103D	CGA TTT CCC CCT ATT CTC CCT CG	Mutagenese von E1B-55kDa
792	Abra. seq fw 6320 bp	CTT GGC GAT GGA GCG CAG G	sequenzieren Ad5
793	Abra. seq fw 6889 bp	GGG ACC GAG GTT GCT ACG G	sequenzieren Ad5
794	Abra. seq fw 7400 bp	CCA GAG CAA AAA GTC CGT GC	sequenzieren Ad5
795	Abra. seq fw 8004 bp	GGT GCG AGG ATG CGA GCC	sequenzieren Ad5
796	Abra. seq fw 8598 bp	GGG GTG TCC TTG GAT GAT GC	sequenzieren Ad5
797	Abra. seq fw 9202 bp	CAT AAC CCA GCG TCG CAA CG	sequenzieren Ad5
798	Abra. seq fw 9756 bp	GTC ACA GTC GCA AGG TAG G	sequenzieren Ad5
799	Abra. seq fw 10347 bp	GTC GTT GCA AGT CCG CAC C	sequenzieren Ad5
800	Abra. seq fw 10912 bp	GCT CGC TCC CTG TAG CCG	sequenzieren Ad5
801	Abra. seq fw 11452 bp	CAT GGC CTG AAT CGC GAG C	sequenzieren Ad5

#	BEZEICHNUNG	SEQUENZ	VERWENDUNG
802	Abra. seq fw 12044 bp	CGA GCG CAT CCA CAA GGC	sequenzieren Ad5
803	Abra. seq fw 12630 bp	CTG GTC TAC GAC GCG CTG C	sequenzieren Ad5
804	Abra. seq fw 13164 bp	GGA CGA GCA TAC TTT CCA GG	sequenzieren Ad5
805	Abra. seq fw 13738 bp	CAG ATG CTA GTA GCC CAT TTC C	sequenzieren Ad5
806	Abra. seq fw 14301 bp	CCC GCC GTT TGT GCC TCC	sequenzieren Ad5
807	Abra. seq fw 14681 bp	GAG TGG GTG GAG TTC ACG C	sequenzieren Ad5
808	Abra. seq fw 15214 bp	CGA CAC CTT TGC CAC ACG G	sequenzieren Ad5
809	Abra. seq fw 15810 bp	CGA GTG ACC ATT ACT GAC GC	sequenzieren Ad5
810	Abra. seq fw 16410 bp	CAT TAG TGC TAT GAC TCA GGG	sequenzieren Ad5
811	Abra. seq fw 17120 bp	GCG ACT GGA AGA TGT CTT GG	sequenzieren Ad5
812	Abra. seq fw 17701 bp	GTG GTT CTT GCA GAT ATG GCC	sequenzieren Ad5
813	Abra. seq fw 18269 bp	CAA CAA AAG GTG GTA GAT GGC	sequenzieren Ad5
814	Abra. seq fw 18838 bp	CCA GAG GAG CTG CTG AGC C	sequenzieren Ad5
815	Abra. seq fw 19338 bp	GTA TTC AAA TAG GTG TCA AAG G	sequenzieren Ad5
816	Abra. seq fw 20005 bp	TCC ATT GGT GAT AGA ACC AGG	sequenzieren Ad5
817	Abra. seq fw 20621 bp	CGA GTG GAA CTT CAG GAA GG	sequenzieren Ad5
818	Abra. seq fw 21217 bp	GCT TCT ATA TCC CAG AGA GC	sequenzieren Ad5
819	Abra. seq fw 21779 bp	CAG TGA GCA GGA ACT GAA AGC	sequenzieren Ad5
820	Abra. seq fw 22332 bp	CAG TGC GCA GAT TAG GAG C	sequenzieren Ad5
821	Abra. seq fw 22903 bp	GAC CGT GCC CGG TCT GGG	sequenzieren Ad5
822	Abra. seq fw 23481 bp	CGT GGT ACT TGT CCA TCA GC	sequenzieren Ad5
823	Abra. seq fw 24100 bp	GGA GTC AGT CGA GAA GAA GG	sequenzieren Ad5
824	Abra. seq fw 24627 bp	GCA AGA TAC CCC TAT CCT GC	sequenzieren Ad5
825	Abra. seq fw 25186 bp	GCA CTA CAC CTT TCG ACA GG	sequenzieren Ad5
826	Abra. seq fw 25768 bp	GCG GTG ACG GTC TAC TGG	sequenzieren Ad5
827	Abra. seq fw 26330 bp	GGA CAT GAT GGA AGA CTG GG	sequenzieren Ad5
828	Abra. seq fw 26932 bp	GGA TTT TTC CCA CTC TGT ATG C	sequenzieren Ad5
829	Abra. seq fw 27475 bp	GTG GTA CTT CCC AGA GAC GC	sequenzieren Ad5
830	Abra. seq fw 28097 bp	GCT AGT TGA GCG GGA CAG G	sequenzieren Ad5
831	Abra. seq fw 28719 bp	CAA GAC ATG GTT AAC TTG CAC C	sequenzieren Ad5
832	Abra. seq fw 29309 bp	CAA TGG GTT TCA AGA GAG TCC	sequenzieren Ad5
833	Abra. seq fw 29861 bp	CGT AGC AAC TGG TCC AGG	sequenzieren Ad5
834	Abra. seq fw 30401 bp	GTG GAC CAC ACC AGC TCC	sequenzieren Ad5
835	Abra. seq fw 30955 bp	CGT TTG TGT TAT GTT TCA ACG TG	sequenzieren Ad5
836	Abra. seq fw 31889 bp	CCA TGG ATC ATC ATG CTC G	sequenzieren Ad5
837	Abra. seq fw 32937 bp	CCG TAG GTC CCT TCG CAG GG	sequenzieren Ad5

#	BEZEICHNUNG	SEQUENZ	VERWENDUNG
838	Abra. seq fw 33475 bp	GAT TCA CAT CGG TCA GTG C	sequenzieren Ad5
839	Abra. seq fw 33772 bp	GGG CCA AGT GCA GAG CG	sequenzieren Ad5
840	E4orf6 fw	GCA GAT CTG TTT GTC ACG CC	sequenzieren Ad5
841	Abra.seq fw 4019 bp	GAA GGC TTC CTC CCC TCC C	sequenzieren Ad5
842	Abra.seq. fw 4407 bp	GGA TGG GTG CAT ACG TGG GG	sequenzieren Ad5
857	Abra. seq. bp1272 rev	CGG GTA GGT CTT GCA GGC	sequenzieren Ad5
908	C283S C288S E1B_Ad5 fw	GGT TCG GGG CTC TGC CTT TTA CTG CTC CTG GAA GGG GG	Mutagenese von E1B-55kDa
909	C283S C288S E1B_Ad5 rev	CCC CCT TCC AGG AGC AGT AAA AGG CAG AGC CCC GAA CC	Mutagenese von E1B-55kDa
910	L180P C184F E1B_Ad5 fw	GCA AAG GTG GCA CCT AGG CCA GAT TTC AAG TAC AAG ATC AGC	Mutagenese von E1B-55kDa
911	L180P C184F E1B_Ad5 rev	GCT GAT CTT GTA CTT GAA ATC TGG CCT AGG TGC CAC CTT TGC	Mutagenese von E1B-55kDa
912	L180A C184S E1B_Ad5 fw	GCA AAG GTG GCA GCT AGG CCA GAT TCC AAG TAC AAG ATC AGC	Mutagenese von E1B-55kDa
913	L180A C184S E1B_Ad5 rev	GCT GAT CTT GTA CTT GGA ATC TGG CCT AGC TGC CAC CTT TGC	Mutagenese von E1B-55kDa
914	C184T E1B_Ad5 fw	GCA AAG GTG GCA CTT AGG CCA GAT ACC AAG TAC AAG ATC AGC	Mutagenese von E1B-55kDa
915	C184T E1B_Ad5 rev	GCT GAT CTT GTA CTT GGT ATC TGG CCT AAG TGC CAC CTT TGC	Mutagenese von E1B-55kDa
916	H344L C348S E1B_Ad5 fw	GGC TGT GAT TAA GCT TAA CAT GGT ATC TGG CAA CTG CGA GG	Mutagenese von E1B-55kDa
917	H344L C348S E1B_ad5 rev	CCT CGC AGT TGC CAG ATA CCA GGT TAA GCT TAA TCA CAG CC	Mutagenese von E1B-55kDa
918	C361S E1B_Ad5 fw	CCT CTC AGA TGC TGA CCT CCT CGG ACG GCA ACT GTC ACC	Mutagenese von E1B-55kDa
919	C361S E1B_Ad5 rev	GGT GAC AGT TGC CGT CCG AGG AGG TCA GCA TCT GAG AGG	Mutagenese von E1B-55kDa
920	H373L H377L E1B_Ad5 fw	GCT GAA GAC CAT TCT CGT AGC CAG CCT CTC TCG CAA GGC	Mutagenese von E1B-55kDa
921	H373L H377L E1B_Ad5 rev	GCC TTG CGA GAG AGG CTG GCT ACG AGA ATG GTC TTC AGC	Mutagenese von E1B-55kDa
922	C393S H396L E1B_Ad5 fw	CAT ACT GAC CCG CTC TTC CTT GCT TTT GGG TAA CAG GAG G	Mutagenese von E1B-55kDa
923	C393S H396L E1B_Ad5 rev	CCT CCT GTT ACC CAA AAG CAA GGA AGA GCG GGT CAG TAT G	Mutagenese von E1B-55kDa
924	C454S C456S E1B_Ad5 fw	CCA GGT GCA GAC CCT CCG AGT CTG GCG GTA AAC ATA TTA GG	Mutagenese von E1B-55kDa
925	C454S C456S E1B_Ad5 rev	CCT AAT ATG TTT ACC GCC AGA CTC GGA GGG TCT GCA CCT GG	Mutagenese von E1B-55kDa

3.3.2 Vektoren

Folgende Vektoren wurden für Subklonierungen oder zur Transfektion als Vektorkontrolle verwendet. In der ersten Spalte angegeben ist die Nummer des Vektors in der *Filemaker Pro*-Datenbank der Arbeitsgruppe.

#	BEZEICHNUNG	VERWENDUNG	REFERENZ
77	pGL2-basic	Luziferase-Assay	Promega
136	pcDNA3	Expressionsvektor für Säugerzellen, CMV-Promotor	Invitrogen
181	pRL-CMV	Luziferase-Assay	Promega

3.3.3 Rekombinante Plasmide

Folgende rekombinante Plasmide wurden im Rahmen der Arbeit verwendet bzw. hergestellt. In der ersten Spalte angegeben ist die Nummer des Plasmids in der *Filemaker Pro*-Datenbank der Arbeitsgruppe.

#	BEZEICHNUNG	VEKTOR	FREMDGEN-EXPRESSION	REFERENZ
2	pC53SN3	pCMV/neo	humanes p53 cDNA	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
608	pXC15	pML	Ad5 E1-Region	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
715	pcDNA3-HA E4orf6	pcDNA3	Ad5 HA E4orf6	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
737	pE1A	pML	Ad5 E1A 12S und 13S	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1010	pcDNA3-E1B-55 kDa	pcDNA3	Ad5 E1B-55kDa	(Moore <i>et al.</i> , 1996)
1154	Ad5pTG-S2 (Noah)	pTG	Ad5	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1156	Ad5pTG-S3 (Abraham)	pTG	Ad5	Stammsammlung der Arbeitsgruppe

#	BEZEICHNUNG	VEKTOR	FREMDGEN- EXPRESSION	REFERENZ
1200	Ad5pTG-S3(Dcm-/Dam-)	pTG	Ad5	diese Arbeit
1235	E1pTG-S3	ppoly2	Ad5 E1 region	diese Arbeit
1236	E1 Box - NES	ppoly2	Ad5 E1 region	diese Arbeit
1237	E1 Box - SUMO	ppoly2	Ad5 E1 region	diese Arbeit
1238	E1 Box - SUMO / NES	ppoly2	Ad5 E1 region	diese Arbeit
1239	E1 Box - V103D	ppoly2	Ad5 E1 region	diese Arbeit
1240	E1 Box - Ubc9	ppoly2	Ad5 E1 region	diese Arbeit
1241	E1 Box - Ubc9 / NES	ppoly2	Ad5 E1 region	diese Arbeit
1245	Ad5pTG-S2 SUMO	ppoly2	Ad5	diese Arbeit
1246	Ad5pTG-S2 SUMO/NES	ppoly2	Ad5	diese Arbeit
1247	Ad5pTG-S2 V103D	ppoly2	Ad5	diese Arbeit
1248	Ad5pTG-S2 Ubc9	ppoly2	Ad5	diese Arbeit
1249	Ad5pTG-S2 Ubc9/NES	ppoly2	Ad5	diese Arbeit
1260	E1 Box - M124T	ppoly2	Ad5 E1 region	diese Arbeit
1262	E1 Box - C283SC288S	ppoly2	Ad5 E1 region	diese Arbeit
1263	E1 Box -H344LC348S	ppoly2	Ad5 E1 region	diese Arbeit
1264	E1 Box - C361S	ppoly2	Ad5 E1 region	diese Arbeit
1265	E1 Box - H373LH377L	ppoly2	Ad5 E1 region	diese Arbeit
1266	E1 Box - C393SH396L	ppoly2	Ad5 E1 region	diese Arbeit
1267	E1 Box - C454SC456S	ppoly2	Ad5 E1 region	diese Arbeit
1269	E1 Box - L180AC184S	ppoly2	Ad5 E1 region	diese Arbeit
1270	E1 Box - C184T	ppoly2	Ad5 E1 region	diese Arbeit
1275	pcDNA3 - E1B C283SC288S	pcDNA3	Ad5 E1B-55kDa	diese Arbeit
1277	pcDNA3 - E1B H344LC348S	pcDNA3	Ad5 E1B-55kDa	diese Arbeit
1279	pcDNA3 - E1B C361S	pcDNA3	Ad5 E1B-55kDa	diese Arbeit
1280	pcDNA3 - E1B H373LH377L	pcDNA3	Ad5 E1B-55kDa	diese Arbeit
1281	pcDNA3 - E1B C393SH396L	pcDNA3	Ad5 E1B-55kDa	diese Arbeit

#	BEZEICHNUNG	VEKTOR	FREMDGEN- EXPRESSION	REFERENZ
1282	pcDNA3 - E1B C454SC456S	pcDNA3	Ad5 E1B-55kDa	diese Arbeit
1283	pcDNA3 - E1B L180PC184F	pcDNA3	Ad5 E1B-55kDa	diese Arbeit
1284	pcDNA3 - E1B L180AC184S	pcDNA3	Ad5 E1B-55kDa	diese Arbeit
1285	pcDNA3 - E1B C184T	pcDNA3	Ad5 E1B-55kDa	diese Arbeit
1300	Ad5pTG-S2 E1B-NES	ppoly2	Ad5 E1 region	diese Arbeit

3.4 Antikörper

3.4.1 Primärantikörper

BEZEICHNUNG	SPEZIFIKATION
2A6	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das E1B-55kDa-Protein von Ad5 (Sarnow <i>et al.</i> , 1982a).
5E10	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das PML Protein (Stuurman <i>et al.</i> , 1992).
6A11	Monoklonaler Ratte-Antikörper gegen das E4orf3-Protein von Ad5 (Nevels <i>et al.</i> , 1999b).
7C11	Monoklonaler Ratte-Antikörper gegen das E1B-55kDa-Protein von Ad5 (B. Härtl, unveröffentlichte Daten).
α-late	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen die späten Strukturproteine von Ad5 (diese Arbeit).
β-Actin (AC-15)	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen β -Actin (Sigma).
B6-8	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das E2A-72 kDa-Protein von Ad5 (Reich <i>et al.</i> , 1983).
DO1	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen ein aminoterminales Epitop von p53 des Menschen (Santa Cruz.) (Vojtesek <i>et al.</i> , 1992).
Fl393	Monoklonaler Kaninchen-Antikörper gegen p53 des Menschen (Santa Cruz.).
M73	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das E1A-Protein von Ad5 (Harlow <i>et al.</i> , 1985).
Mre11	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das humane Mre-11-Protein (Abcam).

RSA#3	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen den Aminoterminal des E4orf6-Proteins von Ad5 (Marton <i>et al.</i> , 1990).
--------------	---

3.4.2 Sekundärantikörper

Folgende Sekundärantikörper wurden für *Western Blot*-Analysen verwendet:

HRP-Anti-Maus IgG	Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper gegen Maus IgGs aus Schaf (Amersham Life Science).
HRP-Anti-Ratte IgG	Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper gegen Ratte IgGs aus Ziege (Amersham Life Science).

Folgende Sekundärantikörper wurden für Immunfluoreszenzanalysen verwendet:

FITC-Anti-Ratte IgG (Fc γ -Fragment)	Fluorescein-isothiocyanat (FITC)-gekoppelter Antikörper gegen Ratte IgGs aus Ziege; AffiniPure gereinigtes F(ab) $_2$ -Fragment (Dianova).
FITC-Anti-Maus IgG (F(ab') $_2$ -Fragment)	Fluorescein-isothiocyanat (FITC)-gekoppelter Antikörper gegen Maus IgGs aus Ziege; AffiniPure gereinigtes F(ab) $_2$ -Fragment (Dianova).
<i>Texas Red</i> -Anti-Ratte IgG (F(ab') $_2$ -Fragment)	<i>Texas Red</i> -gekoppelter Antikörper gegen Ratte IgGs aus Ziege; AffiniPure gereinigtes F(ab) $_2$ -Fragment (Dianova).
<i>Texas Red</i> -Anti-Maus IgG (H + L)	<i>Texas Red</i> -gekoppelter Antikörper gegen Maus IgGs aus Ziege; AffiniPure gereinigtes Gesamtmolekül (H + L; Dianova).

3.5 Größen- und Molekulargewichtsstandards

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Molekülen in Agarosegelen wurde die *1 kb DNA ladder* (Gibco BRL) verwendet.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen bei der SDS-Gelelektrophorese wurde entweder der *Broad Range Marker* (BioRad) oder der *Precision Protein Standard* (BioRad) verwendet.

3.6 Kommerzielle Systeme

Folgende kommerzielle Systeme wurden verwendet:

Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega)

Nucleobond AX Plasmid Midi und Maxi Kit (Macherey Nagel)

Prism Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)

Protein-Assay (BioRad)

QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)

SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce)

3.7 Tiere

TIERE	FIRMA
Sprague-Dawley-Ratten	Charles River (Kißlegg)
New zealand white rabbit	Charles River (Kißlegg)

3.8 Enzyme und Reagenzien

Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Roche und New England Biolabs bezogen. ³⁵[S]-markierte Radiochemikalien wurden von Amersham oder ICN bezogen.

3.9 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Wenn im Text nicht anders aufgeführt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Sigma und Merck, Zellkulturmaterial von den Firmen Falcon, Gibco BRL und Pan, sonstiges Plastikmaterial von den Firmen Falcon, Sarstedt, Greiner und Eppendorf bezogen.

3.10 Computerprogramme und Datenbanken

Texte und Tabellen dieser Arbeit wurden mit Microsoft Office XP Professional (Microsoft) auf einem IBM-kompatiblen Personal Computer erstellt. Zeichnungen, Diagramme und Abbildungen wurden mit den Programmen Corel Draw 8.0 (Corel Systems) sowie Adobe Photoshop 5.0 (Adobe) angefertigt oder nachbearbeitet. Die Auswertung der DNA-Sequenzen erfolgte mit dem Programm SeqEd™ 1.0.3 (Applied Biosystems). Homologie- und Motivsuchen auf Protein- und DNA-Ebene wurden mit den Programmen FASTA und BLAST aus dem Software-Paket UWGCG (Genetics Computer Group) (Devereux *et al.*, 1984) sowie mit Hilfe des BLAST-servers (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Biotechnology Information Center) durchgeführt. Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm BioEdit 4.8.5 erzeugt (Hall, 1999). Konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen wurden mit Hilfe der TCS-NT Software 1.6.569 (Leica) und digitale Immunfluoreszenzbilder mit Meta View 4.6 (Universal Imaging Corporation) erstellt. Zur densitometrischen Auswertung der Bandenintensität von DNA in Agarosegelen wurde die Software *Quantity One* des ChemiDoc-Systems (BioRad) verwendet. Für die Literatursuche wurde die MEDLINE-Datenbank (National Library of Medicine) unter der Adresse (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>) herangezogen.

4 Methoden

4.1 Bakterien

4.1.1 Kulturbedingungen und Lagerung

Plattenkulturen

Mit einem sterilen Zahnstocher wurden ausgehend von einer Bakterienkolonie, einer Flüssigkultur oder einer Glyzerinkultur Bakterien entnommen und auf einer Agarplatte so ausgestrichen, dass nach Inkubation über Nacht Einzelkolonien isoliert werden konnten. Die so erhaltenen Plattenkulturen sind mit Parafilm (Pechiney Plastic Packaging) verschlossen mehrere Wochen bei 4 °C haltbar.

Flüssigkulturen

Für die Anzucht von *E. coli* in Flüssigkultur wurde steriles LB-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und in Gegenwart entsprechender Antibiotika über Nacht bei 37 °C und 150 – 220 UpM in einem Inkubationsschüttler (New Brunswick) inkubiert. Bei Bedarf wurde die Bakterienkonzentration fotometrisch (SmartSpec™ 3000, BioRad), bei einer Wellenlänge von 600 nm, gegen das Medium bestimmt ($1 \text{ OD}_{600} = 8 \times 10^8 \text{ Zellen/ml}$). *E. coli* Kulturen, die ein für E1B-55kDa kodierendes Plasmid enthielten, wurden bei 30 °C und 150 – 220 UpM inkubiert, um eine Transposition von *tn10* (vgl. 3.1.1) in die Plasmid-DNA-Sequenz zu unterdrücken.

Glyzerinkultur

Die Bakterien einer Einzelkolonie wurden in Flüssigkultur genommen und vor Erreichen der stationären Phase abzentrifugiert (4000 UpM, 10 min; Rotixa 120R, Hettich). Das entstandene Sediment wurde in 0,5 ml LB-Medium resuspendiert und in *CryoTubes*™ (Nunc) mit 0,5 ml sterilem Glyzerin vermischt. Die so erhaltenen Dauerkulturen sind nahezu unbegrenzt bei –80 °C haltbar.

LB-Medium	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	5 g/l
	• autoklavieren	
Antibiotika-Stammlösungen	Ampicillin (500 x)	50 mg/ml in H ₂ O _{bid}
	Kanamycin (200 x)	10 mg/ml in H ₂ O _{bid}
	• sterilfiltrieren	
	• bei -20 °C lagern	

4.1.2 Transformation von *E. coli*

4.1.2.1 Rubidiumchlorid-Methode

Die chemische Transformation von *E. coli* erfolgte modifiziert nach Hanahan (1983). Zur Herstellung von kompetenten Bakterien wurden ausgehend von einer Einzelkolonie des gewünschten Bakterienstammes 5 ml TYM-Medium angeimpft und bei 37 °C über Nacht im Schüttler (New Brunswick) bei 220 UpM inkubiert. 100 ml vorgewärmtes TYM-Medium wurde mit 1 ml der Übernachtskultur beimpft, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen und 15 min auf Eis gekühlt. Die Bakteriensuspension wurde auf zwei vorgekühlte 50 ml Reaktionsgefäße (Greiner) verteilt und für 15 min bei 3000 UpM und 4 °C (Rotixa 120R, Hettich) zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 20 ml eiskaltem Tfb I resuspendiert und wiederum 10 min bei 3000 UpM und 4 °C (Rotixa 120R, Hettich) sedimentiert. Danach wurden die Bakterien vorsichtig in 20 ml eiskaltem Tfb II resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (3000 UpM, 10 min und 4 °C; Rotixa 120R, Hettich) wurde das Sediment wieder in 5 ml Tfb II aufgenommen und nach Zugabe von 10 % Glyzerin in Aliquots von je 200 µl aufgeteilt. Die Zellen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die auf diese Weise hergestellten kompetenten Bakterien konnten für mehrere Monate bei -80 °C gelagert werden.

TYM-Medium	Trypton	20 g/l
	Hefeextrakt	20 g/l
	NaCl	100 mM
	MgSO ₄	10 mM
	• autoklavieren	

Tfb I		MOPS, pH 7,0	10 mM
		RbCl ₂	10 mM
		• sterilfiltrieren	
Tfb II		MOPS, pH 6,5	10 mM
		CaCl ₂	50 mM
		RbCl ₂	10 mM
		• sterilfiltrieren	

Zur Transformation wurden zunächst die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und ein Aliquot von 100 µl in vorgekühlte 15 ml Falcon 2059 transferiert und mit 2 µl β-Mercaptoethanol (1,22 M) 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 10 µl des Ligationsansatzes (4.4.8.2) bzw. der Plasmid-Lösung zugegeben (0,1 bis 50 ng) und mit Bakterien vermischt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 40 s bei 42 °C. Daraufhin wurden die Bakterien 2 min auf Eis abgekühlt und danach mit 1 ml auf 42 °C vorgewärmten NZCYM- oder SOC-Medium versetzt. Die Bakterien wurden dann 1 h bei 37 °C im Wasserbad regeneriert, kurz abzentrifugiert und in ca. 50 µl LB mit entsprechenden Antibiotika resuspendiert. Anschließend wurden 10 % und 90 % des kompletten Ansatzes auf LB-Agarplatten mit geeigneten Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

NZCYM		NZ Amin	10 g/l
		NaCl	5 g/l
		Hefeextrakt	2 g/l
		MgSO ₄ · 6 H ₂ O	2 g/l
		Casaminosäuren	1 g/l
		• pH 7,5 einstellen	
		• autoklavieren	
SOC-Medium		Trypton	20 g/l
		Hefeextrakt	5 g/l
		NaCl	10 mM
		KCl	2,5 mM
		MgCl ₂	10 mM
		MgSO ₄	10 mM
		Glukose	20 mM
		• autoklavieren	

4.1.2.2 Elektroporation

Die Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach Sharma und Schimke (1996). 1 l YENB-Medium wurde mit 10 ml einer frischen Übernachtskultur angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,9 bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden 5 min auf Eis gekühlt und anschließend 10 min bei 6000 UpM und 4 °C (Centrikon T-124, Kontron Instruments) abzentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde daraufhin durch Resuspension zweimal mit 100 ml eiskaltem H₂O_{bid} und einmal mit 20 ml 10 %igem Glyzerin gewaschen. Es wurde dann in einem Endvolumen von 3 ml 10 %igem Glyzerin aufgenommen, in Aliquots von je 50 µl aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

YENB		Bacto Yeast Extract	7,5 g/l
		Bacto Nutrient Broth	8 g/l
		• autoklavieren	

Für die Elektroporation von Ligationsansätzen (4.4.8.2) musste dieser zur Entsalzung zunächst gefällt werden. Hierfür wurden zum Ansatz 5 µg Lachssperma-DNA als *carrier*, 1/10 Vol. 3 M NaOAc und 1 Vol. Isopropanol gegeben. Nach 10 min Zentrifugation mit 14000 UpM (Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf) bei RT wurde das Sediment mit EtOH_{75 %} gewaschen, getrocknet und in 10 µl H₂O_{bid} aufgenommen. Die elektrokompenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl der Zellsuspension mit 1 – 10 µl Plasmid-DNA vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (BioRad) mit einem Elektrodenabstand von 1 mm überführt. Die Elektroporation erfolgte in einem *Gene Pulser* (BioRad) nach den Anweisungen des Herstellers bei einer Spannung von 1,25 kV, einer Kapazität von 25 µF sowie einem Parallelwiderstand von 200 Ω. Dabei wurde eine Zeitkonstante von ca. 5 ms erreicht. Nach dem Puls wurden die Zellen sofort mit 1 ml auf 37 °C vorgewärmten YENB-Medium aus den Küvetten gespült, in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt und 1 h bei 37 °C bebrütet. Dann wurden sie abzentrifugiert (8000 UpM, 30 s; Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf), in ca. 50 µl LB mit entsprechenden Antibiotika resuspendiert und auf LB-Nährböden mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

4.2 Säugerzellen

4.2.1 Kulturbedingungen und Lagerung von Säugerzellen

4.2.1.1 Kultivierung von etablierten Säugerzellen als Einschichtkulturen

Adhärenente Zellen wurden als Einschichtkulturen in liegenden Polystyrolflaschen (Falcon) oder Petrischalen (Falcon) kultiviert. Als Nährmedium diente *Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM; Gibco BRL) (Dulbecco und Freeman, 1959) mit 0,11 g/l Natriumpyruvat. Das Medium wurde mit 10 % fötalem Kälberserum (Pan) angereichert und mit 1 % einer Penicillin/Streptomycin-Lösung (1000 U/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin in 0,9 % NaCl; Pan) versetzt. Zur Inhibition von Komplementfaktoren im fötalen Kälberserum wurde dieses vor Gebrauch aufgetaut und bei 56 °C 30 min inaktiviert. Die Zellen wurden bei 37 °C in einem CO₂-Inkubator (Heraeus) mit 7 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert und regelmäßig mit frischem Medium versorgt. Alle 3 – 5 Tage (abhängig von der Zelldichte) wurden die Zellen im Verhältnis 1 : 4 bis 1 : 10 subkultiviert.

Dazu wurde das Medium abgesaugt, die adhärenenten Zellen mit sterilem PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (Pan) von den Zellkulturgefäßen abgelöst. Nach Kompetition der Proteaseaktivität des Trypsins durch Zugabe von 1 Vol. angereichertem Medium wurden die abgelösten Zellen in einem Polystyrol-Röhrchen (Greiner) abzentrifugiert (2000 UpM, 3 min; Rotixa 120R, Hettich). Der Überstand wurde anschließend abgesaugt und die Zellen in einem kleinen Volumen angereichertem DMEM resuspendiert. Danach wurden die Zellen in einem geeigneten Verhältnis auf neue Kulturgefäße verteilt, welche bereits vorgewärmtes Medium mit 10 % fötalem Kälberserum enthielten.

PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	NaCl	140 mM
	KCl	3 mM
	Na ₂ HPO ₄	4 mM
	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
	• pH 7,0 – 7,7 einstellen	
	• sterilfiltrieren oder autoklavieren	

4.2.1.2 Gewinnung und Kultivierung primärer Rattennierenzellen

Zur Gewinnung primärer Rattennierenzellen wurden die Nieren von 4 – 6 Tage alten *Sprague-Dawley*-Ratten unter semisterilen Bedingungen entnommen und bis zur Weiterverarbeitung in einem 50 ml Reaktionsgefäß (Greiner) mit sterilem PBS bei RT aufbewahrt.

Die Nieren wurden dann unter sterilen Bedingungen mit Pinzette und Skalpell in einer Petrischale mit sterilem PBS mechanisch zerkleinert und in ein 50 ml Reaktionsgefäß (Greiner) überführt. Je 20 Nieren wurden in 20 ml sterilem PBS mit 1 mg/ml Collagenase/Dispase (Roche) bei 37 °C für 3 – 4 h unter mehrmaligem Schütteln im Brutschrank inkubiert. Nach Zentrifugation (2000 UpM, 4 °C, 10 min; Rotixa 120R, Hettich) wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet zweimal mit je 20 ml sterilem PBS gewaschen und in angereichertem DMEM-Medium (4.2.1.1) resuspendiert und kultiviert. Schließlich wurden pro 175 cm²-Zellkulturflasche (Falcon) die Zellen von je 2 Nieren in vorgewärmtem Medium mit 10 % fötalen Kälberserum ausgesät und im CO₂-Brutschrank (Heraeus) in 7 %iger CO₂-Atmosphäre bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt und die Zellen wie beschrieben (4.2.1.1) weiterkultiviert.

4.2.1.3 Lagerung von Säugerzellen

Für die dauerhafte Lagerung von Säugerzellen wurden subkonfluente Zellen nach vorheriger Ablösung durch Trypsin/EDTA (4.2.1.1) 3 min bei 4 °C und 2000 UpM (Rotixa 120R, Hettich) zentrifugiert und das Zellsediment in 1 ml fötalem Kälberserum mit 10 % DMSO (Sigma) aufgenommen und in 1,8 ml *CryoTubes*TM (Nunc) überführt. Die Zellen wurden dann schrittweise eingefroren (2 h bei -20°C, 24 h bei -80 °C) und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zur Rekultivierung wurden die tiefgefrorenen Zellen rasch bei 37 °C aufgetaut und in ein 15 ml Reaktionsgefäß (Greiner) mit 10 ml vorgewärmten Medium überführt und abzentrifugiert (2000 UpM, 3 min, RT; Rotixa 120R, Hettich), um vorhandenes DMSO zu entfernen. Daraufhin wurden die Zellen in frisches Medium überführt und bei 37 °C wie unter 4.2.1.1 beschrieben kultiviert.

4.2.2 Bestimmung der Gesamt-Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurden die Zellen trypsiniert (4.2.1.1) und je nach Zelldichte verdünnt. Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurde ein 100 µl Aliquot der Zellsuspension mit 1 Vol. Trypanblau-Lösung versetzt, wobei der Farbstoff nur in abgestorbene Zellen eindringen kann; lebende bleiben hingegen farblos. Nachdem das Aliquot in die Zählkammer überführt worden war, wurden die Zellen aus 16 Kleinquadraten des kammereigenen Rasters im Lichtmikroskop (Leica DM IL) ausgezählt. Unter Berücksichtigung der Verdünnung ergibt sich nach Multiplikation der Zellzahl mit dem Faktor 10^4 die Anzahl der Zellen pro ml Gesamtkultur.

Trypanblau-Lösung	Trypanblau	0,15 %
	NaCl	0,85 %

4.2.3 Transfektion von Säugerzellen

4.2.3.1 Kalziumphosphat-Methode

Adhärenente Säugerzellen wurden nach der Kalziumphosphat-Methode (Graham und van der Eb, 1973) in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (6-well Schale; Falcon) oder Zellkulturpetrischalen mit einem Durchmesser von 100 mm (Falcon) transfiziert. Die Methode beruht auf der Ausbildung von Kalziumphosphat-Kristallen, welche die zu transfizierende DNA einschließen, an der Zelloberfläche adsorbieren und phagozytiert werden.

Die Zellen wurden mit einer Dichte von $2,5 \times 10^4$ Zellen/cm² ausgesät und 20 – 24 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert (4.2.1.1), so dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Dichte von 40 – 60 % hatten. Eine Stunde vor Transfektionsbeginn wurde das Medium gewechselt. Für die Transfektion einer Petrischale wurden 30 µg Gesamt-DNA in 500 µl Gesamtvolumen aus sterilem H₂O_{bid} und 250 mM CaCl₂ aufgenommen und in Polystyrol-Reaktionsröhrchen (Falcon) unter leichtem Mischen (Vortex, 1000 UpM) langsam zu 500 µl 2 x BBS zugetropft. Für die Transfektion einer

Zellkulturschale mit sechs Vertiefungen (6-*well* Schale; Falcon) wurden 10 µg Gesamt-DNA in 300 µl Gesamtvolumen aus sterilem H₂O_{bid} und 250 mM CaCl₂ aufgenommen und in Polystyrol-Reaktionsröhrchen (Falcon) unter leichtem Mischen (Vortex, 1000 UpM) langsam zu je 300 µl 2 x BBS zugetropft. Nachdem die Röhrchen für die Ausbildung des Präzipitats 20 min bei RT inkubiert worden waren, wurde der Inhalt auf die Zellen getropft und kurz geschwenkt. Nach ca. 16 h im Brutschrank wurde das Medium gewechselt und die transfizierten Zellen wurden je nach Versuchsansatz entsprechend weiterkultiviert.

2 x BBS (<u>B</u> ES <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)	BES	50 mM
	NaCl	280 mM
	Na ₂ HPO ₄	1,5 mM
	• pH 7,02 exakt einstellen • sterilfiltrieren	
2,5 M CaCl₂	CaCl ₂	2,5 M
	• sterilfiltrieren	

4.2.3.2 GeneJammer®-Methode

Um möglichst gleichmäßige und reproduzierbare DNA-Mengen in eukaryotische Zellen zu transfizieren wurde das GeneJammer®-Transfektionssystem von Stratagene benutzt. Das Prinzip dieser Methode beruht dabei auf der spontanen Anlagerung von positiv geladenen kationischen Lipiden zu Liposomen oder kleinen Vesikeln, welche die negativ geladene DNA umschließen. Diese Lipid-DNA-Komplexe fusionieren anschließend mit der Zellmembran und ermöglichen somit den Transport der DNA in die Zellen.

24 h vor der Transfektion wurden 3×10^6 adhärenente Zellen in 100 mm-Zellkulturschalen (Falcon) ausgesät und mit 8 ml Medium (DMEM, 10 % fötales Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin) kultiviert. Die Zellen waren am nächsten Tag zu 60 – 80 % konfluent und wurden mit max. 4 µg DNA und 20 µl GeneJammer®-Transfektionsreagenz nach Angaben des Herstellers transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen (4.2.6) und für SDS-PAGE (4.5.4) verwendet.

4.2.4 Transformation primärer Zellen

Dazu wurden 3×10^6 primäre Rattennierenzellen, die, wie unter Punkt 4.2.1.2 beschrieben, 2 Tage vor Versuchsbeginn kultiviert worden waren, auf 100 mm-Petrischalen (Falcon) mit DMEM (10 % fötales Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin) ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach der Kalziumphosphat-Methode (4.2.3.1) transfiziert.

Drei Tage nach Transfektion wurden die Zellen trypsiniert (4.2.1.1) und auf jeweils drei 100 mm-Petrischalen (Falcon) ausgesät. Danach wurde jeden fünften Tag das Medium gewechselt. Nach 3 – 4 Wochen starben die meisten nicht transfizierten Zellen ab, wohingegen Zellen, in denen die adenoviralen Genprodukte exprimiert wurden, zu Zellkolonien (*Foci*) auswuchsen. Diese konnten mit Kristallviolett-Färbelösung gefärbt und ausgezählt werden oder zur Etablierung von stabilen Zelllinien genutzt werden (4.2.5).

Kristallviolett-Färbelösung		Kristallviolett	1 % (w/v)
		Methanol	25 % (v/v)

4.2.5 Etablierung stabil transformierter Zelllinien

Die bei 4.2.4 erhaltenen Zellkolonien (*Foci*) wurden entweder vereinigt (polyklonal) oder mit Hilfe von sterilen Glasringen (Nunc; Durchmesser: 5 mm) einzeln isoliert (monoklonal). Dazu wurde die Unterseite der Glasringe mit Hilfe einer Pinzette in sterile Vaseline getaucht und auf diese Weise flüssigkeitsdicht auf die zu isolierenden *Foci* gesetzt, die vorher mit PBS gewaschen worden waren. In die Glasringe wurde dann 50 µl Trypsin/EDTA-Lösung (Pan) pipettiert. Nach einigen Minuten konnten die abgelösten Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt werden, in die 100 µl fötales Kälberserum (Pan) vorgelegt worden war. Nach anschließender Zentrifugation (5000 UpM, 3 min, 4 °C; Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf) wurden die Zellen in geeigneten Zellkulturschalen kultiviert und als Zelllinien etabliert.

4.2.6 Ernte von Säugerzellen

Für die Zellernte wurde zuerst das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Plastischabers (Sarstedt) vom Boden der Zellkulturschale (Falcon) abgeschabt, in ein 15 ml Reaktionsgefäß (Greiner) überführt und bei 4 °C 3 min bei 2000 UpM (Rotixa 120R, Hettich) zentrifugiert. Es folgte ein Waschschrift mit 10 ml kaltem PBS und anschließender Zentrifugation (4 °C, 2000 UpM, 3 min; Rotixa 120R, Hettich). Das erhaltene Zellsediment wurde entweder bei -80 °C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

4.3 Adenoviren

4.3.1 Gewinnung von Virus aus DNA

Adenovirale DNA-Bacmide wurden wie unter 4.4.2 beschrieben hergestellt und anschließend durch Spaltung mit der Restriktionsendonuclease *PacI* vom bakteriellen Anteil befreit (vgl. 4.4.8.1). Diese linearisierte DNA wurde mit $1/10$ Vol. 3 M NaOAc und 1 Vol. Isopropanol gefällt und je 30 µg gesplattene Bacmid-DNA pro 100 mm-Petrishale (Falcon) in 911-Zellen nach der Kalziumphosphat-Methode (4.2.3.1) transfiziert. Nach ca. 16 h im Brutschrank wurde das Medium gewechselt und die transfizierten Zellen wurden solange weiterkultiviert, bis sich die Zellen von der Unterlage ablösten (jedoch max. 5 Tage). Hatten sie sich zu diesem Zeitpunkt noch nicht vom Boden der Petrischale (Falcon) gelöst, wurden die Zellen mit einem Zellschaber (Sarstedt) abgeschabt, bei 2000 UpM für 5 min pelletiert (Rotixa 120R, Hettich), in 5 ml DMEM ohne fötalem Kälberserum durch viermaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37 °C im Wasserbad lysiert und abermals zentrifugiert (4400 g bei RT für 10 min). Mit dem erhaltenen Überstand wurde erneut eine Petrischale (Falcon), die subkonfluent mit 60 – 80 % 911-Zellen bewachsen war, reinfiziert (4.3.4). Dieser Vorgang wurde solange wiederholt (in der Regel 2 – 5 mal) bis sich die infizierten Zellen alleine vom Boden ablösten.

Hatten sich die Zellen in der angegebenen Zeit abgerundet und waren von der Unterlage abgefallen, wurden die Zellen wie oben beschrieben geerntet, gewaschen und lysiert. Mit dem erhaltenen Überstand wurde nun eine 175 cm²-Zellkulturflasche (Falcon) infiziert (4.3.4). Da im Überstand schon eine beträchtliche Menge an Adenovirus enthalten war fielen die infizierten Zellen bald nach Infektion ab und der Überstand nach der Ernte und Lyse konnte für die Herstellung hochtitriger Virusstocks (4.3.2) benutzt werden.

4.3.2 Herstellung und Lagerung hochtitriger Virusstocks

Für die Gewinnung hochtitriger Virusstocks wurden sieben 175 cm²-Zellkulturflaschen (Falcon) entweder mit 10 ffu/Zelle (wenn bekannt) oder mit dem Überstand aus 4.3.1 infiziert. 2 - 3 Tagen nach Infektion war ein deutlicher zytopatischer Effekt sichtbar, das Medium verfärbte sich gelblich und die Zellen lösten sich vom Untergrund. Da 90 % der produzierten Viren an den Zellen assoziiert bleiben (Jakoby und Pastan, 1979), wurden die Zellen (falls nötig) abgeklopft und bei 2000 UpM für 5 min (Rotixa 120R, Hettich) abzentrifugiert. Das Pellet wurde einmal in PBS⁺ gewaschen, in 6 ml 100 mM HEPES/pH 7,2 resuspendiert und anschließend durch viermaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37 °C im Wasserbad lysiert. Das Lysat wurde mit 4400 g bei RT für 10 min zentrifugiert und der erhaltene Überstand auf einen diskontinuierlichen CsCl-Gradienten geladen. Zur Herstellung des CsCl-Gradienten wurde in ein 13 ml SW-40 Ultrazentrifugen-Röhrchen (Beckman) 2 ml einer 1,4 g/ml CsCl-Lösung vorgelegt und dann mit 2,5 ml einer 1,25 g/ml CsCl-Lösung vorsichtig überschichtet. Anschließend wurde der oben hergestellte Überstand auf den CsCl-Gradienten gegeben und im Ausschwenkrotor SW40 in der Ultrazentrifuge (Centrikon T-2170, Kontron Instruments) 1 h bei 35000 UpM und 15 °C zentrifugiert. An der Grenzschicht zwischen den beiden CsCl-Lösungen bandierten die Adenovirus-Partikel und konnten abgezogen werden. Dieser sog. CsCl-Stock wurde im Anschluss titriert (4.3.3) und war bei -80 °C über Jahre haltbar (wobei mehrmaliges Einfrieren und Auftauen vermieden werden sollte).

Eine Alternative zur CsCl-Methode stellt die Herstellung von Medium-Stocks dar. Hierfür wurden die infizierten Zellen wie oben beschrieben geerntet und gewaschen aber dann in 5 ml DMEM ohne fötalem Kälberserum durch viermaliges Einfrieren und Auftauen (siehe oben) aufgebrochen. Nach anschließender Zentrifugation (4500 UpM für 10 min und RT; Rotixa 120R, Hettich) wurde der Überstand abgenommen, mit 87 %igem Glycerin (steril; 10 % Endkonzentration) versetzt und austitriert (4.3.3). Auch diese Stocks sind über lange Zeit bei -80 °C konservierbar, haben aber den Vorteil, dass sie kein toxisches CsCl enthalten.

PBS⁺ (<i>phosphate buffered saline</i> with Ca^{2+} and Mg^{2+})	NaCl	140 mM
	KCl	3 mM
	Na ₂ HPO ₄	4 mM
	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
	CaCl ₂	
	MgCl ₂	
	<ul style="list-style-type: none"> • pH 7,0 – 7,7 einstellen • sterilfiltrieren oder autoklavieren 	
1,4 g/ml CsCl-Lösung	CsCl	62,0 g
	<ul style="list-style-type: none"> • auf 100 ml mit 1 x HBS 	
1,25 g/ml CsCl-Lösung	CsCl	36,16 g
	<ul style="list-style-type: none"> • auf 100 ml mit 1 x HBS 	
10 x HBS (<i>hepes buffered saline</i>)	NaCl	8,0 g
	KCl	0,224 g
	HEPES	5,96 g
	<ul style="list-style-type: none"> • pH 7,4 einstellen 	
	<ul style="list-style-type: none"> • auf 100 ml mit H₂O_{bid} 	

4.3.3 Titerbestimmung

Der Titer der Virusstocks wurde immunhistochemisch als *fluorescent forming units* (ffu) pro ml bestimmt. Im Gegensatz zum *Plaque Assay* (Jakoby und Pastan, 1979), bei dem die Fähigkeit der Viren zu infizieren und anschließend die Zellen zu lysieren und *Plaques* zu bilden gemessen wird, konzentriert sich die Bestimmung der ffu nur auf die frühen Infektionsereignisse, repräsentiert durch die immunhistochemische Bestimmung des frühen adenoviralen E2A-72kDa Proteins.

Dazu wurden in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (6-well Schale; Falcon) 5×10^5 911-Zellen (3.1.2) pro Vertiefung in DMEM (Gibco BRL) mit 10 % fötalem Kälberserum (Pan) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Pan) ausgesät. 10 – 14 h später wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 3 ml/Vertiefung vorgewärmten PBS⁺ gewaschen und mit 1 ml Virusstockverdünnung (10^{-3} bis 10^{-5} in Infektionspuffer) infiziert. Die Zellen wurden dann 1 h bei 37 °C im Brutschrank (Heraeus) inkubiert und währenddessen alle 15 min vorsichtig geschwenkt, um die Virusadsorption zu gewährleisten. Anschließend wurde die Virusstockverdünnung abgenommen, die Zellen mit 3 ml/Vertiefung angereichertem Medium überschichtet und im Brutschrank bei 37 °C für 20 h inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt, die Zellen 3 x mit PBS⁺ für 5 min gewaschen und mit 1 ml/Vertiefung eiskaltem (-20 °C) Methanol für 20 min (4.5.8.2) fixiert. Dann wurde der Alkohol abgenommen und die Zellkulturschalen 5 min bei RT getrocknet. Für die anschließende immunhistochemische Färbung wurden die Zellen 2 x je 5 min mit 3 ml/Vertiefung TBS-BG gewaschen, 3 h mit 1:10 Verdünnung von B6-8 in TBS-BG (1 ml Antikörperverdünnung/Vertiefung) bei RT inkubiert, erneut 3 x mit TBS-BG (3 ml/Vertiefung) jeweils 5 min gewaschen und anschließend mit je 1 ml/Vertiefung der zweiten Antikörperverdünnung (FITC-Anti-Maus IgG; 1:1000 in TBS-BG) für 3 h bei RT inkubiert. Abschließend wurde die Antikörperverdünnung abgenommen, abermals 3 x mit TBS-BG (3 ml/Vertiefung) jeweils 5 min gewaschen und mit 1 ml TBS-BG versetzt. Die so vorbereiteten Zellen waren bis zu 48 h ohne Signalverlust bei 4 °C lagerbar und wurden mit dem Immunfluoreszenzmikroskop (Zeiss) ausgezählt. Unter Berücksichtigung der Verdünnung des Virusstocks und der Vergrößerung des Mikroskops konnte somit die Anzahl der infektiösen Partikel als ffu/ml Virusstock bestimmt werden.

Infektionspuffer

CaCl ₂	2 mM
MgCl ₂	2 mM
fötales Kälberserum	0,2 %
Penn/Strep	1 %
• in PBS	

TBS-BG	NaCl	137 mM
	HCl	3 mM
	MgCl ₂	1,5 mM
	Tween 20	0,05 %
	Natriumazid	0,05 %
	Gycin	5 mg/ml
	BSA	5 mg/ml
	Tris/HCl pH 7,6	20 mM

4.3.4 Infektion mit Adenoviren

Für die Infektion mit Adenoviren wurden Zellen so ausgesät, dass sie am nächsten Tag subkonfluent (60 – 80 %) herangewachsen waren. Die Zellen wurden nach Absaugen des Mediums mit vorgewärmten PBS gewaschen und mit warmen DMEM-Medium ohne fötalem Kälberserum [für 100 mm-Petrischale (Falcon) 3 ml], welches die gewünschte Anzahl infektiöser Partikel enthielt, überschichtet. Die Zellen wurden dann 1 h bei 37 °C inkubiert und währenddessen alle 15 min vorsichtig geschwenkt. Anschließend wurde die Infektionslösung abgenommen, die Zellen mit DMEM-Medium mit 10 % fötalem Kälberserum und 1 % Penn/Strep. überschichtet [für 100 mm-Petrischale (Falcon) 8 ml] und im Brutschrank bei 37 °C in der Regel für 6 – 72 h inkubiert.

4.3.5 Bestimmung der Virusreplikation

Zellen, in denen die Virusreplikation untersucht werden sollte (A549, HeLa, H1299 und primäre Amniozyten), wurden mit definierten Mengen an wt und Mutanten Ad5 (A549 und H1299 mit 5 ffu/Zelle; HeLa mit 10 ffu/Zelle; Amniozyten mit 40 ffu/Zelle) infiziert (4.3.4) und zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 0 h und 72 h nach Infektion geerntet (4.2.6). Anschließend wurden sie in RIPA lysiert (4.5.1) und die Proteinmenge bestimmt (4.5.3). Für den Test wurden dann genau 5,35 µg Gesamtprotein des Zelllysates (mit der enthaltenen viralen DNA) eingesetzt, mit Tween 20 (Endkonzentration 0,5 %) und Proteinase K (Endkonzentration 100 µg/ml) vermengt und mit H₂O_{bid} auf 24,5 µl aufgefüllt. Sämtliche Proteine des Ansatzes wurden dann durch eine einstündige Inkubation bei 55 °C abgebaut. Im Anschluss wurde der verbliebene Rest an Proteinase K durch 10 min bei 100 °C im Heizblock

(Thermomixer comfort, Eppendorf) inaktiviert und mit Hilfe der PCR (4.4.7) die relative Menge viraler Genome im Ansatz bestimmt. Dazu wurden zum Ansatz je 1 µl der dNTPs (je 1 mM), 5 µl 10 x PCR-Puffer, je 0,2 µM fw und rev Primer (#64 und #110) und 0,5 µl thermostabile *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/µl) (Roche) zugegeben und mit H₂O_{bid} auf 50 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde in dünnwandigen 0,2 ml Reaktionsgefäßen (Biozym) in einem Thermocycler (*GeneAmpTMPCR System 9700*, Perkin Elmer) nacheinander wie folgt inkubiert:

30 s bei	95 °C	Aufschmelzen der DNA
1 min bei	55 °C	Hybridisieren der Oligonukleotide an die Zielsequenz
1 min bei	72 °C	Polymerisation

Dieser Zyklus wurde 20 mal durchlaufen, gefolgt von einer fünfminütigen Inkubation bei 72 °C um 3'-Enden nicht vollendeter PCR-Produkte aufzufüllen. 25 µl der so amplifizierten DNA wurden auf einem 1 % Agarosegel elektrophoretisch (4.4.5) aufgetrennt und mit Hilfe des ChemiDoc-Systems (BioRad) quantifiziert und ausgewertet.

4.3.6 Ermittlung der Anzahl infektiöser Nachkommenviren

Zellen, in denen die Anzahl der infektiösen Nachkommenviren untersucht werden sollte (A549, HeLa, H1299 und primäre Amniozyten), wurden wie unter 4.3.5 angegeben infiziert und 24 h, und 48 h nach Infektion geerntet (4.2.6). Anschließend wurden die Zellen in DMEM ohne fötalem Kälberserum durch viermaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37 °C im Wasserbad lysiert und dann bei 2000 UpM für 10 min bei RT zentrifugiert (Rotixa 120R, Hettich). Die Zahl der infektiösen Partikel im Überstand wurde wie unter 4.3.3 angegeben bestimmt. Aus dieser Zahl, der Verdünnung und der Anzahl der in den Versuch eingesetzten Viren konnte die Zahl der Nachkommenviren berechnet werden.

4.4 DNA-Techniken

4.4.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur analytischen Isolierung kleiner Mengen an Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde ein von Beck und Mitarbeiter modifiziertes Verfahren der alkalischen Lyse eingesetzt (Beck *et al.*, 1993). Dabei wurden 1,5 ml Übernachtskultur für 1 min bei 14000 UpM (Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf) abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 200 µl Puffer A resuspendiert. Die Suspension wurde dann mit 400 µl Puffer B versetzt, vorsichtig mehrmals geschwenkt, 5 min bei RT inkubiert, 300 µl Puffer C zugegeben, erneut 5 min bei RT inkubiert und anschließend ebenfalls bei RT für 10 min bei 14000 UpM (Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf) zentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde in neues 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt und die DNA 10 min bei 14000 UpM (Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf) gefällt. Der Überstand wurde abgeschüttet und das DNA-Präzipitat mit 1 ml EtOH_{75 %} gewaschen, getrocknet und in 50 µl H₂O_{bid} gelöst. Die so isolierte DNA konnte für Restriktions- und Sequenzanalysen eingesetzt werden.

Puffer A	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNAse A	100 µg/ml
	• Lagerung bei 4 °C	
Puffer B	NaOH	200 mM
	SDS	1 % (w/v)
Puffer C	Ammoniumazetat	7,5 M
	• Lagerung bei 4 °C	

Die präparative Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA aus 100 – 1000 ml Übernachtskultur erfolgte über die Anionenaustauscher-Säulen AX 100 und AX 500 (Macherey Nagel) nach Anweisungen des Herstellers.

4.4.2 Präparation adenoviraler DNA-Bacmide aus *E. coli*

Zur präparativen Isolierung von adenoviraler Bacmid-DNA aus *E. coli* wurde, neben der Reinigung der DNA über Anionentauscher-Säulen (4.4.1), auch die Isolierung von DNA über CsCl-Gradienten benutzt (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurden 500 ml Kulturvolumen analog zu dem Vorgehen bei AX 500 (Macherey Nagel) mit den mitgelieferten Puffern S1, S2 und S3 aufgeschlossen. Anschließend wurde die Lösung für 15 min bei 4 °C und 4000 UpM im GS3-Rotor (Centrikon T-124, Kontron Instruments) zentrifugiert und der Überstand in einen sterilen 250 ml Zentrifugenbecher filtriert. Das Filtrat wurde mit 0,6 Vol. Isopropanol versetzt, 10 min bei RT inkubiert, 15 min bei RT und 5000 UpM im GS3-Rotor zentrifugiert, einmal mit EtOH_{75 %} gewaschen und anschließend in 3 ml TE pH 8,0 aufgenommen. Für die Herstellung des CsCl-Gradienten wurden 3 g CsCl zugegeben und bei 30 °C gelöst. Danach wurde die DNA-CsCl-Lösung mit 240 µl Ethidium-Bromid-Lösung (10 mg/ml) gemischt und 5 min bei RT und 8000 UpM im SS34-Rotor (Centrikon T-124, Kontron Instruments) zentrifugiert. Nur die rote Flüssigkeit unter dem „pelzartigen Schwamm“ wurde mit einer Pasteurpipette in ein SW40-Ultrazentrifugen-Röhrchen (Beckman) überführt und 24 h bei 20 °C und 60000 UpM in SW40-Rotor zentrifugiert (Centrikon T-2170, Kontron Instruments). Die prominente Bande der *covalently closed circular* DNA (cccDNA) wurde durch Punktierung des Ultrazentrifugen-Röhrchen mit einer Injektionsnadel entnommen, fünfmal mit 1-Butanol vorsichtig ausgeschüttelt und gegen TE pH 8,0 dialysiert. Die so gewonnene Bacmid-DNA war von sehr guter Qualität und konnte für die Klonierung (4.4.8) der entsprechenden Punktmutanten benutzt werden.

TE-Puffer		Tris	50 mM
		EDTA	10 mM
		• pH 8,0 einstellen	

4.4.3 Isolierung adenoviraler DNA aus gereinigten Viruspartikeln

Für die Reinigung viraler DNA aus Viruspartikeln wurden 200 – 400 µl gereinigter CsCl-Stock mit TE-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 500 µl gebracht und in Slide-

A-Lyser Dialyse Rahmen (Pierce) gegen PBS im Kühlraum über Nacht dialysiert. Am nächsten Tag wurde die dialysierte Lösung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) transferiert, mit 25 µl 10 % SDS (Endkonzentration 0,5 %) und 5 µl 20 mg/ml Proteinase K (Endkonzentration 0,2 mg/ml) versetzt und mindestens 4 h oder über Nacht bei 37 °C inkubiert. Um die noch vorhandenen Proteinreste von der DNA zu trennen wurde die Lösung mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) 2 min gevortext und dann bei 5000 UpM für 4 min zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf). Die obere Phase (wässrige Phase mit der DNA) wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt, erneut mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) 2 min gevortext und zentrifugiert (5000 UpM, 4 min; Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf). Um Phenolreste aus der Lösung zu entfernen wurde die obere Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) gegeben und dann zweimal wie oben beschrieben mit je 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gewaschen. Nach dem letzten Waschschriff wurde die obere Phase abermals in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt, mit $\frac{1}{10}$ Vol. 3 M NaOAc und 1 Vol. Isopropanol gefällt und das DNA-Pellet in 40 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,0 aufgenommen. Die Konzentration der DNA wurde wie bei 4.4.4 angegeben bestimmt und Qualität über Agarose-Gelelektrophorese (4.4.5) eines Aliquots überprüft.

4.4.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA wurde mit Hilfe eines Spektralfotometers (Uvikon Spektralfotometer 930, Kontron Instruments) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dazu wurde die DNA-Lösung in eine Quarzküvette (1 cm Schichtdicke) gegeben und ein UV-Absorptionsspektrum über den Wellenlängenbereich von 230 bis 300 nm aufgenommen. Alternativ wurde die DNA mit dem SmartSpec™ 3000-System von BioRad bei 260 nm vermessen. Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine Absorption von 1,0 im Absorptionsmaximum bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml. Für einzelsträngige Oligonukleotide gilt die Näherungsformel $1 \text{ OD}_{260} = 20 \text{ µg/ml}$.

4.4.5 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Proben wurden sowohl für analytische als auch für präparative Zwecke in 0,6 – 1,5 %igen Agarosegelen (w/v) elektrophoretisch aufgetrennt. Hiefür wurde eine entsprechende Menge Agarose (*Seakem® LE agarose*, FMC Bioproducts) in einer Mikrowelle (Moulinex) in 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst, auf ca. 50 °C abgekühlt und zur späteren Färbung der DNA mit 50 ng/ml Ethidiumbromid versetzt. Die noch flüssige Agarose-Gellösung wurde dann in eine vorbereitete Flachbettgelapparatur gegossen. Die DNA-Proben wurden mit jeweils $\frac{1}{10}$ Vol. Auftragspuffer versetzt und auf das verfestigte Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 5 – 10 V/cm. Analytische Gele wurden auf einem UV-Durchlichtschirm (Bachofer) bei einer Wellenlänge von 312 nm visualisiert und mit einem Geldokumentationssystem (Gel Print 2000i, MWG-Biotech) dokumentiert. Bei präparativen Gelen wurden zur Schonung der DNA mit langwelligem UV-Licht (365 nm) angeregt, und die entsprechenden DNA-Banden ausgeschnitten. Um die DNA-Schäden durch UV-Licht weiter zu minimieren wurde bei präparativen Gelen zusätzlich 1 mM Guanosin in die Gellösung eingebracht.

50 x TAE	Tris	2 M
	NaOAc	0,25 M
	EDTA	50 mM
	• mit Eisessig pH 7,8	
DNA-Auftrags-Puffer	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
	Xylencyanol	0,25 % (w/v)
	Glyzerin	50 % (v/v)
	50 x TAE	2 % (v/v)
Ethidiumbromid-Stammlösung	Ethidiumbromid	10 mg/ml
	• Lagerung bei 4 °C, lichtgeschützt	

4.4.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten kleiner 10 kb aus Agarosegelen erfolgte nach einer Methode, die sich die Affinität von Nukleinsäuren an SiO₂-Partikel in Anwesenheit eines chaotropen Salzes zunutze macht. Zur Herstellung der dafür notwendiger Reagenzien siehe (Boyle und Lew, 1995). Zu präparierende DNA-Banden wurden zunächst unter langwelligem UV-Licht (365 nm) mit einem Skalpell aus dem mit Ethidiumbromid gefärbten Gel ausgeschnitten. Die Agaroseblöckchen wurden anschließend in 600 µl 6 M NaI-Lösung 5 min bei 55 °C aufgelöst. Danach wurde der Ansatz mit jeweils 30 µl Glasmilch versetzt, 5 min auf Eis inkubiert (Adsorption der DNA an die Glaspartikel) und 15 s bei 14000 UpM (Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-haltige Glaspulver zweimal mit je 700 µl Waschpuffer gewaschen, erneut abzentrifugiert, (14000 UpM, 1 min, RT; Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf) vom Überstand befreit und 5 min bei 55 °C getrocknet. Die DNA wurde durch Zugabe von 20 – 50 µl H₂O_{bid} 5 min bei 55 °C eluiert. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 14000 UpM (Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf) wurde der DNA-haltige Überstand vorsichtig abgezogen und dessen Konzentration über Agarose-Gelelektrophorese (4.4.5) eines Aliquots abgeschätzt.

Glasmilch	Silica-Partikel, Ø = 0,5 – 10 µm	100 mg/ml
	NaI	3 M
	• Herstellung: siehe (Boyle und Lew, 1995)	
Waschpuffer	NaCl	50 mM
	Tris/HCl, pH 7,5	10 mM
	EDTA	2,5 mM
	EtOH _{abs}	50 % (v/v)

Da bei der Reinigung der DNA über Glasmilch die Anzahl der Strangbrüche proportional zur Größe des zu reinigenden DNA-Fragmentes zunimmt, ist diese Methode nur für kleinere DNA-Stücke sinnvoll. Für die Isolierung von DNA-Fragmenten größer 10 kb, und insbesondere für die Isolierung von Bacmid-DNA-

Fragmenten aus Agarosegelen, wurde daher ein alternatives Verfahren verwendet. Dabei wurde ein Agaroseblock mit der zupräparierenden DNA-Bande zunächst unter langwelligem UV-Licht (365 nm) aus einem 0,6 %igen Gel ausgeschnitten und anschließend für 2 h bei RT und 20000 UpM im SS34-Rotor (Centrikon T-124, Kontron Instruments) zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde dann mit $1/10$ Vol. 3 M NaOAc und 1 Vol. Isopropanol gefällt, das DNA-Pellet in 40 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,0 aufgenommen und die Konzentration und Qualität der DNA-Lösung über Agarose-Gelelektrophorese (4.4.5) eines Aliquots überprüft.

4.4.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Standard-PCR-Ansatz

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) (Saiki *et al.*, 1988) ist ein Verfahren zur exponentiellen Vermehrung (Amplifikation) definierter Nukleinsäure-Sequenzen In-vitro.

Für einen 50 µl Standard-Reaktionsansatz wurden ca. 100 ng Plasmid-DNA eingesetzt, weiterhin je 100 pmol der entsprechenden Oligonukleotide, 8 µl dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP und dTTP je 2 mM), 5 µl 10 x PCR-Puffer und 5 U thermostabile *Taq*-DNA-Polymerase (Roche). Dieser Ansatz wurde in dünnwandigen 0,2 ml Reaktionsgefäßen (Biozym) in einem Thermocycler (*GeneAmpTMPCR System 9700*, Perkin Elmer) nacheinander wie folgt inkubiert:

1 min bei	95 °C	Aufschmelzen der DNA
1 min bei	55 – 70 °C	Hybridisieren der Oligonukleotide an die Zielsequenz
1 min pro kb bei	72 °C	Polymerisation

Dieser Zyklus wurde 30 mal durchlaufen, gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation bei 72 °C um 3'-Enden nicht vollendeter PCR-Produkte aufzufüllen. 5 µl der so amplifizierten DNA wurden auf einem Agarosegel elektrophoretisch (4.4.5) aufgetrennt und unter UV-Licht hinsichtlich Fragmentgröße und Ausbeute überprüft.

Einführen von Mutationen durch PCR

Die In-vitro-Punktmutagenese rekombinanter Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) nach den Anweisungen des Herstellers. Dazu wurde ausgehend von zwei komplementären Oligonukleotiden, welche die gewünschten Mutationen in der Zielsequenz enthielten, das gesamte Plasmid amplifiziert. Die Zyklen-Abfolge war dabei wie folgt:

30 s bei	95 °C	Aufschmelzen der DNA
1 min bei	55 °C	Hybridisieren der Oligonukleotide an die Zielsequenz
2 min pro kb bei	68 °C	Polymerisation

4.4.8 Klonierung von DNA-Fragmenten

4.4.8.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme

Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen New England Biolabs und Roche bezogen und zusammen mit den dazu gehörigen 10 x Puffern gemäß den Angaben des Herstellers eingesetzt. Um Pufferunverträglichkeiten bei der Spaltungen mit mehreren Enzymen zu umgehen, wurde die DNA gegebenenfalls nach jedem einzelnen Verdau mit $1/10$ Vol. 3 M NaOAc und 1 Vol. Isopropanol gefällt und erneut in H_2O_{bid} aufgenommen. Für analytische Spaltungen wurden in der Regel 0,5 – 1 µg DNA sowie je 3 – 10 U Restriktionsenzym eingesetzt und, falls nicht anders angegeben, 1 h bei 37 °C inkubiert. Präparative Restriktionsspaltungen enthielten 5 - 20 µg DNA und je 50 U Enzym, bei einer Inkubation bei 37 °C für mindestens 2 h. Bei der Klonierung von adenoviralen Bacmid-DNAs wurde je 1 µg DNA mit 25 U Restriktionsenzym gespalten (*SwaI* bei 30 °C für 20 h; *BstZ17I* bei 37 °C für 4 h). Zu spaltende PCR-Produkte wurden nach der PCR-Reaktion zunächst über NaOAc/Isopropanolfällung von nicht inkorporierten Oligonukleotiden und dNTPs gereinigt und konzentriert und anschließend durch Restriktionsenzyme gespalten. Nach Spaltung der verschiedenen Ausgangs-DNAs wurden die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt (4.4.5) und gegebenenfalls aus dem Gel gereinigt (4.4.6).

4.4.8.2 Ligation und Transformation

Mit Restriktionsenzymen linearisierte Vektor-DNA wurde, um eine Religation des Vektors zu verhindern, direkt im Anschluss an deren Spaltung entweder mit 1 U alkalischer Phosphatase (SAP, *shrimp alkaline phosphatase*, Roche) für 30 min bei 37 °C oder mit 5 U tsAP (*thermosensitive alkaline phosphatase*, Roche) für 30 min bei 37 °C und anschließend mit 65 °C für 45 min dephosphoryliert. DNA-Fragmente wurden vor der Ligation jeweils, wie unter 4.4.6 beschrieben, aufgereinigt und deren Konzentration abgeschätzt. Ein Standard-Ligationsansatz enthielt 20 - 100 ng Vektor-DNA sowie die drei- bis fünffache molare Menge an zu klonierender Fremd-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 4 µl 5 x Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase (Roche). Für die kovalente Verknüpfung der Phosphodiesterbrücken wurde der Ansatz über Nacht bei 13 °C inkubiert und anschließend zur Transformation in *E. coli* (4.1.2 oder 4.1.2.2) eingesetzt.

4.4.8.3 Identifizierung rekombinanter Klone

Ausgehend von den transformierten *E. coli*, die auf LB-Agarplatten mit geeigneten Antibiotika wuchsen, wurden Einzelkolonien mit einem sterilen Zahnstocher in LB-Flüssigmedium mit geeigneten Antibiotika überimpft und über Nacht bei 37 °C mit 220 UpM inkubiert. Plasmid-DNA wurde durch alkalische Lyse (4.4.1) präpariert und in 50 µl H₂O_{bid} aufgenommen. Je 5 µl davon wurden durch Spaltung mit geeigneten Restriktionsenzymen (4.4.8.1) und anschließender Agarose-Gelelektrophorese (4.4.5) analysiert. Die so identifizierten rekombinanten Klone wurden durch DNA-Sequenzierung (4.4.9) überprüft und als Glyzerinkultur (4.1.1) aufbewahrt.

4.4.9 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung eines Plasmids kleiner 8 kb wurden 500 ng Plasmid-DNA und 6 pmol des entsprechenden Oligonukleotids mit H₂O_{bid} auf ein Endvolumen von 8 µl aufgefüllt und mit 9,5 µl des Reaktionsgemisches (*Prism Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit*, Applied Biosystems) gemischt. Bei der

Sequenzierung von adenoviraler Bacmid-DNA und Ad5-DNA wurden 2,5 µg DNA und 25 pmol des entsprechenden Oligonukleotids in 6 µl Endvolumen mit 11,5 µl Reaktionsgemisches (mit 4 µl Sequenziermix anstatt 2 µl) eingesetzt. In beiden Fällen wurde dann im Anschluss eine Amplifikation mit 60 Zyklen (15 s bei 96 °C, 15 s bei 55 °C und 4 min bei 60 °C) durchgeführt. Die Reaktionsprodukte wurden nach den Angaben des Herstellers gereinigt und in einem 7 %igen denaturierenden Polyacrylamid-Sequenziergel aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm SeqEd™, Version 1.0.3 (Applied Biosystems). Die DNA-Sequenzierungen dieser Arbeit wurden von Holger Melzl am Institut durchgeführt.

4.5 Protein-Techniken

4.5.1 Gesamtzellextrakt aus Säugerzellen

Die Zellen einer 100 mm-Petrischale (Falcon) wurden in einer entsprechenden Menge gekühltem Lysepuffer (4.5.7) resuspendiert und dann 30 min auf Eis gestellt. Um einen vollständigen Zellaufschluss zu gewährleisten, wurden die Zelllysate zweimal für 30 s mit Ultraschall (*output* 0,60, 0,8 Impulse/s; Branson Sonifier 450) behandelt, wobei die Reaktionsgefäße (Greiner) zwischen den Sonifikationsschritten auf Eis gelagert wurden. Größere Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (4000 UpM, 10 min, 4 °C; Rotixa 120R, Hettich) abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) transferiert und für weitere Experimente verwendet.

4.5.2 In-vivo-Proteinmarkierung mit [³⁵S]-Methionin und [³⁵S]-Cystein

Für die In-vivo-Markierung von Proteinen mit [³⁵S]-Methionin und [³⁵S]-Cystein wurden 3 × 10⁶ HeLa-Zellen pro 100 mm-Petrischale (Falcon) in DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum ausgesät, am Folgetag mit 30 ffu/Zelle der verschiedenen Virusmutanten infiziert (4.3.4), zu unterschiedlichen Zeitpunkten radioaktiv markiert und geerntet. Für die Markierung wurde eine Stunde vor dem gewünschten

Zeitpunkt das Medium abgesaugt, einmal mit 5 ml vorgewärmten PBS und einmal mit 5 ml warmen DMEM (ohne Methionin und Cystein) mit 2 % fötalem Kälberserum gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 15 min mit 8 ml vorgewärmten DMEM (ohne Methionin und Cystein) mit 2 % fötalem Kälberserum prä-inkubiert um in den Zellen vorhandene Reservoirs an Methionin und Cystein aufzubrechen. Dann wurde das Medium mit 3 ml neuem Medium ersetzt, dem jedoch [³⁵S]-Methionin und [³⁵S]-Cystein (100 µCi/100 mm-Petrischale) zugesetzt waren. Die Zellen wurden nun unter mehrmaligem Schwenken 1 h bei 37 °C im Brutschrank (Heraeus) inkubiert. Im Anschluss wurde das radioaktive Medium abgenommen, die Petrischalen auf eine eisgekühlte Unterlage gestellt und 2 x mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann geerntet und in 50 µl RIPA (vgl. 4.5.7) plus Proteaseinhibitor Cocktail (Roche) lysiert (4.5.1). Nach dem die Zelltrümmer abzentrifugiert waren (14000 UpM, 4 °C, 5 min; Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf) wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt, jeweils 2 µl des Überstandes auf Nitrozellulose-Membranen (Protran, Schleicher & Schuell) getropft und 1 x in PBS gewaschen. Die Membran wurde dann bei RT getrocknet, die Radioaktivität des Aliquots mit dem *Phospho-Imager-Screen* (Kodak) detektiert und mit Hilfe des *Phospho-Imager System Personal FX* (BioRad) ausgewertet und quantifiziert.

Angeglichene Mengen an radioaktiv markierten Proteinen wurden dann mittels SDS-PAGE (4.5.4) aufgetrennt und die Signale wurden durch eine 30-minütige Inkubation der Gele bei RT in 1 M Natriumsalicylat verstärkt. Anschließend wurden die Gele auf WhatmanTM-Filtern transferiert und im Vakuumtrockner (Drysar, H. Hözl) 2 h bei 70 °C getrocknet. Die Exposition des *Phospho-Imager-Screen* (Kodak) erfolgte entweder für 1 h oder über Nacht und wurde über das *Phospho-Imager System Personal FX* (BioRad) ausgewertet und quantifiziert.

4.5.3 Quantitative Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration löslicher Proteine einer Probe wurde mit Hilfe des *Protein-Assays* (BioRad) bestimmt. Dieses Testverfahren, das auf der Proteinquantifizierung nach Bradford beruht (Bradford, 1976), misst die auftretende Absorptionszunahme bei 595 nm, nachdem die vorhandenen Proteine an das chromogene Substrat dieses Testsystems gebunden haben. Die Proteinkonzentration in der Probe lässt sich durch Vergleich der gemessenen OD₅₉₅ mit den Werten einer Eichkurve ermitteln. Unterschiedliche Verdünnungen der zu bestimmenden Proteinprobe und 1–10 µg des Eichproteins BSA (Rinderserumalbumin, Sigma) wurden in Polystyrol-Küvetten (Sarstedt) mit PBS jeweils auf ein Gesamtvolumen von 400 µl aufgefüllt und nach Zugabe von 100 µl Färbereagenz 5–30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm fotometrisch gegen den Nullwert (400 µl PBS + 100 µl Färbereagenz) bestimmt.

4.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine in Gegenwart eines hohen SDS-Überschusses elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dabei lagert sich das negativ geladene SDS in konstanten Gewichtsverhältnissen an die Proteine an und kompensiert deren positive Ladung so, dass die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine zur Anode primär durch deren Proteingröße bestimmt wird. Nach Laemmli werden die Proteine unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel konzentriert und wandern von dort gemeinsam in das Trenngel ein (Laemmli, 1970).

Durchführung

Der Aufbau der Gelapparaturen und das Gießen der Gele erfolgte entsprechend den Angaben der Hersteller. Die genaue Zusammensetzung der benötigten Gellösungen sind unten aufgeführt (Harlow und Lane, 1988).

Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 1 Vol. 2 x SDS-Probenpuffers (Sambrook *et al.*, 1989) versetzt und 3 – 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 20 mA pro Gel in TGS-Puffer bis die Bromphenolblau-Bande das Ende des Gels erreichte. Im Anschluss an die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese konnten die aufgetrennten Proteine über *Western Blot*-Analysen detektiert (4.5.6) oder autoradiografisch (4.5.2) nachgewiesen werden.

30 % Acrylamid-Stammlösung	Acrylamid	29 % (w/v)
	N, N'Methylenbisacrylamid	1 % (w/v)
Sammelgel (5 %)	Acrylamid-Stammlösung	17 % (v/v)
	Tris/HCl, pH 6,8	120 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	APS	0,1 % (w/v)
	TEMED	0,1 % (v/v)
Trenngel (8 %)	Acrylamid-Stammlösung	27 % (v/v)
	Tris/HCl, pH 8,8	250 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	APS	0,1 % (w/v)
	TEMED	0,06 % (v/v)
Trenngel (12 %)	Acrylamid-Stammlösung	40 % (v/v)
	Tris/HCl, pH 8,8	250 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	APS	0,1 % (w/v)
	TEMED	0,04 % (v/v)
Trenngel (15 %)	Acrylamid-Stammlösung	50 % (v/v)
	Tris/HCl, pH 8,8	250 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	APS	0,1 % (w/v)
	TEMED	0,04 % (v/v)
TGS-Puffer	Tris	25 mM
	Glycin	200 mM
	SDS	0,1 % (w/v)

2 x SDS- Probenpuffer	Tris/HCl, pH 6,8	100 mM
	SDS	4 % (w/v)
	DTT	200 mM
	Bromphenolblau	0,2 % (w/v)
	Glyzerin	20 %

4.5.5 Färbung von Polyacrylamidgelen

Für die Detektion der Proteine wurden Polyacrylamidgele nach der Elektrophorese (4.5.4) entweder mit Hilfe des kolloidalen Coomassie-Systems *Deep Blue* (EnerGene) mit einer Nachweisgrenze von 100 ng oder über das Silberfärbungs-Reagenz *Silver Surfer* (EnerGene) mit einem Detektionsvermögen von 100 pg nach den Anweisungen des Herstellers gefärbt. Zur Dokumentation wurden die Gele anschließend auf WhatmanTM-Filtern 2 h im Vakuumtrockner (Drystar, H. Hölzel) bei 70 °C getrocknet und in Plastikfolie eingeschweißt.

4.5.6 Western Blot

Proteintransfer auf Nitrozellulose

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurden diese nach Auftrennung über Polyacrylamidgele (4.5.4) nach dem *Western Blot*-Verfahren auf Nitrozellulose-Membranen (Protran, Schleicher & Schuell) übertragen. Der Transfer erfolgte mit Hilfe einer *Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell* (BioRad) nach Anleitung des Herstellers in *Towbin*-Puffer bei einer Stromstärke von 400 mA für 90 min. Auf der Membran immobilisierte Proteine wurden anschließend mit Ponceau S reversibel angefärbt und die Markerbanden (*broad range standard*, BioRad) angezeichnet. Alternativ dazu wurde ein vorgefärbter Standard (*precision protein standard*, BioRad) benutzt, wobei die Übertragung der Polypeptide ebenfalls mit Ponceau S überprüft wurde.

Bindung des spezifischen Antikörpers

Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurde die Nitrozellulose-Membran in PBS mit 4 % (w/v) Magermilchpulver (Glücksklee) über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Anschließend wurde die Membran in einer Lösung des spezifischen Antikörpers (Verdünnung in PBS mit 1 % (w/v) Magermilchpulver) für 1 h bei RT inkubiert.

Nach der Bindung des primären Antikörpers wurde die Membran dreimal kurz in PBS-Tween geschwenkt, dann dreimal 5 min in PBS-Tween gewaschen und danach für 1 h in einer 1 : 5000 Verdünnung des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers geschüttelt. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal kurz in PBS-Tween geschwenkt und dann dreimal 5 min in PBS-Tween gewaschen. Im Anschluss folgte die Detektion über die Enzym-Substrat vermittelte Farbreaktion.

Detektion über Enzym-Substrat vermittelte Farbreaktion

Für den spezifischen Proteinnachweis wurde das *SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce) verwendet. Das Verfahren beruht auf dem Prinzip der verstärkten Chemilumineszenz unter Beteiligung des Enzyms HRP und stellt ein nicht radioaktives Nachweisverfahren von hoher Sensitivität dar.

Hierfür wurden nach Abgießen des letzten Waschpuffers (nach Angaben des Herstellers) die beiden Detektionslösungen 1 : 1 gemischt und in einer Menge von etwa 0,125 ml/cm² auf den Nitrozellulosefilter gegeben. Nach 5 min Inkubationszeit wurde der Nitrozellulosefilter kurz abgetropft und in Folie eingeschlagen. Das Signal wurde mit einem Röntgenfilm (X-OMAT[™] AR, Kodak) bzw. mit dem ChemiDoc-System (BioRad) detektiert.

Towbin-Puffer	Tris/HCl, pH 8,3	25 mM
	Glycin	200 mM
	SDS	0,05 % (w/v)
	Methanol	20 % (v/v)
Ponceau S	Ponceau S	0,2 % (w/v)
	Trichloressigsäure	3 % (w/v)
	Sulfosalicylsäure	3 % (w/v)
PBS-Tween	Tween 20	0,05 % (v/v)
	• in PBS	

4.5.7 Immunpräzipitation

Das Prinzip der Immunpräzipitation beruht auf der spezifischen Erkennung eines Zielproteins durch einen an eine Sepharose-Matrix gekoppelten Antikörper, was eine Isolierung der entsprechenden Proteine bzw. Proteinkomplexe ermöglicht. Die Kopplung von Antikörpern aus Maus und Kaninchen erfolgte an Protein A-Sepharose (Sigma), die von Ratten-Antikörpern an Protein G-Sepharose (Sigma). Sowohl Protein A als auch G binden spezifisch an den Fc-Teil von Antikörpern was eine indirekte Kopplung der Antikörper an die Sepharose-Matrix zur Folge hat. Wenn nun ein Protein oder ein Proteinkomplex an das Epitop des gebundenen Antikörpers bindet kann dieser Protein-Antikörper-Komplex auf Grund des hohen Molekulargewichts der Sepharose ebenfalls abzentrifugiert werden. Durch Erhitzen des Präzipitats für 3 min auf 95 °C in einem geeigneten Probenpuffer werden die Protein-Protein Wechselwirkungen aufgehoben und alle Proteine in Lösung gebracht. Diese können dann im darauffolgenden *Western Blot* (4.5.6) detektiert werden. Durch das Präzipitieren eines Proteins mit Hilfe eines anderen, antikörpergebundenen Proteins (co-Präzipitation) ist es möglich, spezifische Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Dabei ist die Stringenz des eingesetzten Lysepuffers von maßgeblicher Bedeutung.

Durchführung

Für 10 Ansätze wurden 30 mg lyophilisierte Protein A- oder G-Sepharose in 1 ml Lysepuffer (NP-40, RIPA-*light* oder RIPA) 2 h bei 4 °C in einem Überkopfschüttler (GFL, Gesellschaft für Labortechnik) äquilibriert. Die Suspension wurde daraufhin bei 4 °C 5 min bei 6000 UpM abzentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf), das Sediment in 1 ml gekühltem Lysepuffer gewaschen und in 1 ml Hybridomüberstand oder in 1 ml PBS mit 10 – 20 µg gereinigtem Antikörper aufgenommen. Die Bindung der Antikörper an die Matrix fand während der anschließenden Inkubation für 2 h bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler (GFL, Gesellschaft für Labortechnik) statt. Die Suspension wurde daraufhin erneut bei 6000 UpM für 5 min, 4 °C (Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf) abzentrifugiert, die Sepharose in 1 ml gekühltem Lysepuffer gewaschen,

abzentrifugiert (6000 UpM, 5 min, 4 °C; Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf) und mit kaltem Lysepuffer wieder auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt. Pro Ansatz wurden 100 µl dieser Suspension mit der entsprechenden Menge Zelllysate (150 – 1000 µg Gesamtprotein) gemischt (4.5.3) und über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler (GFL, Gesellschaft für Labortechnik) inkubiert. Zur Eliminierung einer unspezifischen Bindung der Proteine aus dem Zelllysate mit der Sepharose-Matrix wurde der zu untersuchende Zellextrakt vorher mit je 100 µl der äquilibrierten Protein A- bzw. G-Sepharose für 1 h auf einem Überkopfschüttler (GFL, Gesellschaft für Labortechnik) bei 4 °C vorinkubiert und nach Zentrifugation (6000 UpM, 5 min, 4 °C; Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf) eingesetzt. Die nach der Immunpräzipitation erhaltene Suspension wurde abzentrifugiert (6000 UpM, 5 min, 4 °C; Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf), dreimal mit je 1 ml kaltem Lysepuffer gewaschen, zentrifugiert (6000 UpM, 5 min, 4 °C; Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf) und das Sediment in 25 – 50 µl SDS-Probenpuffer (4.5.4) aufgenommen. Anschließend konnten die Proben im SDS-Polyacrylamidgel (4.5.4) aufgetrennt und weiter analysiert werden.

NP-40 (niedrige Stringenz)	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	5 mM
	Nonidet P-40	0,15 % (v/v)

RIPA-light (mittlere Stringenz)	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	5 mM
	Nonidet P-40	1 % (v/v)
	SDS	0,1 % (w/v)
	Triton X-100	0,1 % (v/v)

RIPA (hohe Stringenz)	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	5 mM
	Nonidet P-40	1 % (v/v)
	SDS	0,1 % (w/v)
	Na- Desoxycholat	0,5 % (v/v)

4.5.8 Immunfluoreszenz

4.5.8.1 Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA)

Subkonfluente, adhärenente Zellen wurden in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (6-well Schale; Falcon) auf sterilen Deckgläsern oder in Petrischalen (100 mm, Falcon) auf sterilen Objektträgern bei 37 °C kultiviert. Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen gegebenenfalls transfiziert (4.2.3.1) oder infiziert (4.3.1) und weitere 24 - 48 h inkubiert. Zur Fixierung der Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Deckgläser bzw. die Objektträger zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 2 % Paraformaldehyd (in PBS) für 10 min bei RT inkubiert. Nach Entfernung des Paraformaldehyds erfolgte die Permeabilisierung durch PBS mit 0,5 % Triton X-100. Nach einer Inkubationsdauer von 15 min bei RT wurden die Zellen schließlich mit 4 % Paraformaldehyd (in PBS) für 10 min fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. In PBS war eine Lagerung der Zellen bei 4 °C für eine Woche möglich. Die anschließende Immunfärbung erfolgte wie bei 4.5.8.3 beschrieben.

4.5.8.2 Fixierung mit Methanol

Subkonfluente, adhärenente Zellen wurden wie bei 4.5.8.1 beschrieben kultiviert und gegebenenfalls transfiziert (4.2.3.1) oder infiziert (4.3.1). Zur Fixierung der Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Deckgläser bzw. Objektträger mit PBS gewaschen und für 10 min in Methanol bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen 5 min bei RT getrocknet und konnten bei -20 °C mehrere Wochen gelagert oder sofort für die Immunfluoreszenz (4.5.8.3) verwendet werden.

4.5.8.3 Immunologischer Nachweis

Für die Immunfluoreszenz wurden die Deckgläser auf Parafilm (Pechiney Plastic Packaging) überführt, kurz mit PBS-Tween gewaschen und zur Absättigung unspezifischer Bindestellen 30 min mit 30 µl PBS-Tween mit 4 % (w/v) Magermilchpulver oder mit 30 µl PBS-Tween mit 1 % BSA inkubiert. Bei

Verwendung von Objektträgern wurden zuvor kreisrunde Bereiche markiert, in denen die Färbungen stattfinden sollten, und die umgebenden Flächen getrocknet, um ein Verlaufen der Antikörperlösungen zu verhindern. Die Absättigung unspezifischer Bindestellen erfolgte analog zur Deckglas-Methode. Nach Entfernung des Überstandes und einem Waschschrift in PBS-Tween wurden pro Deckglas bzw. pro Färberegion des Objektträgers 30 µl Primärantikörper (geeignete Verdünnung in PBS mit 1 % BSA) zugegeben und 1 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Dann wurden die Zellen dreimal in PBS-Tween gewaschen und anschließend 45 min abgedunkelt mit 30 µl Sekundärantikörper inkubiert. Fluoreszenzgekoppelte, sekundäre Antikörper wurden als 1:100 Verdünnung in PBS mit 1 % BSA verwendet, wobei zur Anfärbung des Chromatins 0,5 µg/ml DAPI (4',6-Diamidin-2'-Phenylindol Dihydrochlorid) zugesetzt wurde. Nichtgebundener zweiter Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS-Tween entfernt. Sämtliche Inkubationsschritte wurden bei RT durchgeführt. Die Deckgläser wurden nun mit der zellenbewachsenen Seite nach unten auf einen neuen Objektträger gelegt und mittels *Glow Mounting Medium* (EnerGene) eingebettet. Bei den zellbewachsenen Objektträgern war die Vorgehensweise genau umgekehrt. Hierbei wurden die bewachsenen Objektträger mit der Zellseite nach oben gelegt, mit *Glow Mounting Medium* (EnerGene) versehen und mit neuen Deckgläsern bedeckt. Die Versuchsansätze konnten nun abgedunkelt bei 4 °C mehrere Tage bis wenige Wochen gelagert werden.

Die weitere Analyse erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laserscanningmikroskops (LEICA) der Klinik für Neurologie am Bezirksklinikum Regensburg oder eines institutseigenen Immunfluoreszenzmikroskops (LEICA) mit digitalem Bildverarbeitungssystem.

4.5.9 Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen die späten Strukturproteine von Ad5

Adenovirus-Partikel wurden wie unter 4.3.2 beschrieben hergestellt und durch intensive Bestrahlung mit UV-Licht wurde die DNA zerstört. Diese so gewonnen nicht-infektiösen Kapsid-Partikel wurden nun für die Immunisierung vorbereitet. Dazu wurde die Hälfte der Proteinlösung (250 µl) mit 500 µl TiterMax Classic Adjuvant (Sigma) durch zweiminütiges aufziehen und ausdrücken in einer Spritze mit Kanüle gemischt. Nachdem sich eine zähflüssige Wasser-Öl-Emulsion gebildet hatte, wurden die verbliebenen 250 µl der Proteinlösung zugegeben und erneut für ca. 1 min durch wiederholtes aufziehen und ausdrücken in einer Spritze mit Kanüle gemischt. Vor der Erstimmunisierung wurde dem Kaninchen aus der Ohrvene Blut (Präimmunserum) entnommen. Im Anschluss daran wurde die Emulsion dem Versuchstier subkutan, intrakutan und intramuskulär an verschiedenen Stellen injiziert. Vier Wochen später erfolgte die Zweitimmunisierung wie beschrieben und weitere zwei Wochen später wurde die gebildete Immunantwort durch Entnahme von Blut und Test des Serums im *Western Blot* (4.5.6) überprüft. Dies wurde solange wiederholt (jedoch max. 4 x) bis eine ausreichende Immunreaktion generiert worden war und das Tier durch Herzpunktion ausgeblutet wurde. Die Injektionen und die Herzpunktion führte der Tierarzt Dr. Thilo Spruß (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Regensburg) durch.

Zur Aufbereitung des Serums wurde das Blut 3 - 4 h bei RT inkubiert (bis es auskoagoliert war) und dann anschließend 2 h bei 2000 UpM (Rotixa 120R, Hettich) zentrifugiert. Das Serum wurde nun vom Blutkuchen abgezogen, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

4.6 Luziferase-Versuch

Zur quantitativen Bestimmung von Promotoraktivitäten wurde das *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (Promega) nach Anweisungen des Herstellers verwendet. Dazu wurde ein p53-induzierbares Promotor-DNA-Fragment (*responsive element*, RE) in

den Vektor pGL2-Basic vor das Luziferase-Gen aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* kloniert (pRE-Luc) und zusammen mit einem konstitutiv p53-exprimierenden Plasmid (pCMV-p53) in p53^{-/-} H1299-Zellen transfiziert. Gleichzeitig wurde in diese Zellen Expressionsplasmide verschiedener E1B-Mutanten co-transfiziert und deren Auswirkungen auf die Stimulierung der Promotoraktivität von pRE-Luc durch pCMV-p53 untersucht. Als interne Kontrolle wurde zusätzlich der mitgelieferte Vektor pRL-TK transfiziert, der das Luziferase-Gen aus *Renilla reniformis* unter Kontrolle des konstitutiven Thymidin-Kinase-Promotors enthält. Beide Luziferasen sind unter unterschiedlichen Bedingungen aktiv und können somit unabhängig voneinander angeregt und vermessen werden. Die Messung der *Renilla*-Luziferase (pRL-TK) wurde nun dazu benutzt die verschiedenen Lysate zu normieren und der Wert der Promotoraktivität wurde als Quotient aus *Photinus*-Luziferase-Aktivität zu *Renilla*-Luziferase-Aktivität berechnet.

Für die Versuche wurden 1×10^5 H1299-Zellen in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (6-well Schale; Falcon) ausgesät und am nächsten Tag mit 0,1 µg pRL-TK, 0,25 µg pRE-Luc, 25 ng pCMV-p53 und 1 µg pcDNA3-E1B bzw. pcDNA-E1B-Mutanten mit der GeneJammer®-Methode transfiziert (4.2.3.2). Nach 48 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, 500 µl *passive lysis buffer* (Promega) pro Ansatz auf die Zellen gegeben und 20 min bei RT inkubiert. Durch pipettieren wurden die Zellen daraufhin vollständig abgelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff vollständig lysiert. Nach dem Auftauen wurden die Zellfragmente bei RT für 5 min bei 14000 UpM (Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf) abzentrifugiert und der Überstand konnte bei Bedarf für 2 Wochen bei -20 °C gelagert werden. Alle weiteren Arbeitsschritte zur Ermittlung der Promotoraktivität wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt und die Promotoraktivitäten mit einem Luminometer (Lumat LB 9507, Berthold) bestimmt.

5.1 Identifizierung funktionell aktiver Bereiche im E1B-55kDa-Protein durch Mutationsanalyse

5.1.1 Sequenzvergleiche der E1B-Proteine unterschiedlicher Serotypen

Ad5 E1B-55kDa ist ein multifunktionelles Protein und spielt eine entscheidende Rolle während der produktiven Adenovirus-Infektion. Wie mit Hilfe von E1B-Deletionsmutanten herausgefunden wurde, ist es unter anderem wichtig für die effiziente virale DNA-Replikation, den selektiven Transport später viraler mRNAs ins Zytoplasma und deren Expression bei gleichzeitigem Abschalten der Wirtsproteinsynthese (*host shut-off*) (Babiss *et al.*, 1985; Pilder *et al.*, 1986). Zusätzlich reprimiert E1B die transaktivierenden Funktionen des Tumorsuppressorproteins p53, ist beteiligt an dessen proteolytischen Abbau und an der effektiven Produktion von Nachkommenviren (Yew und Berk, 1992; Yew *et al.*, 1994; Querido *et al.*, 1997; Steegenga *et al.*, 1998; Querido *et al.*, 2001b).

Um die verschiedenen Funktionen des adenoviralen Polypeptides zu separieren bzw. um neue funktionelle Domänen zu identifizieren wurde mit Hilfe von Datenbankvergleichen nach hochkonservierten Regionen im E1B gesucht, welche zusätzlich definierte Motive enthalten sollten (Abb. 4 und 5).

166	DDFEEAIRVYAKV	ALRPDCKYK	ISKLVN	Ad5
165	EDWEEAIKKYAKI	ALRPDCKYI	VTKTVN	Ad9
151	EDMECAIKAFACL	ALRPDCSYRI	TKTVT	Ad12
151	EDFELALNTFAKV	ALRPDTIYT	IKKTVN	Ad40
168	DDWEVAIRNYAKL	ALRPDKKYK	ITKLIN	Ad4
164	DDWEVAIKNYAKI	ALRPDKQYK	ISRRIN	Ad35

Abb. 4 Aminosäurevergleich des E1B-55kDa-Proteins verschiedener Serotypen.

Dargestellt sind die E1B-55kDa-Aminosäuresequenzen aller bekannter Subgenera humaner Adenoviren mit jeweils einem Vertreter (Ad4, Gruppe E; Ad5, Gruppe C; Ad9, Gruppe D; Ad12, Gruppe A; Ad35, Gruppe B und Ad40, Gruppe F). Konservierte Bereiche sind grau unterlegt. Die Aminosäuren die dem konservierten BC-Box-Motiv entsprechen sind rot gekennzeichnet.

277	DVRVRG	CAFYC	CWKG	VVCRPKSRASIKKCLFERCTLGI	Ad5		
276	ASKIRG	CKFYG	CWMG	VVGRPESEMSVKQCVFEKCYLGV	Ad9		
262	KVSARG	CTFYG	CWKGLVGRPKSKLSVKKCLFEKCVLAL	Ad12			
262	RVSARG	CTFVA	CWKG	VVGRNKSQMSVKKCVFERCIMAM	Ad40		
279	QVGVRG	CSFSANWMGVVGR	TKSMLS	VKKCLFERCHLGV	Ad4		
275	QVSVRG	CSFYA	CWIATA	GRTKSQLSLKKCIFQRCNLGI	Ad35		
315	LSEGN	SRVRHNVASDCGCFMLVKS	VAVIK	HNMVCGNCE	Ad5		
314	STEGN	ARVRHCSLETGCFCLVKGTASLK	HNMVCGCTD	Ad9			
300	IVEGDA	HIRHNAASENACFVLLKGMAILK	HNMVCGVSD	Ad12			
300	VVEGQ	ARIRHNAGSDNVCFLLLKGTASVK	HNMI	CGGGH	Ad40		
317	MSEGE	ARIRHCASTETGCFVLCKGNAKIK	HNMI	CGASD	Ad4		
313	LNEGE	ARVRHCASTDTGCFILIKGNASVK	HNMI	CGASD	Ad35		
353	DRASQ	MLT	CS	DGNCHLLKTIHVASHSRKA	WPVFEHNIL	Ad5	
352	ERMYN	MLT	CD	SGVCHILKNIHVTSHPRKK	WPVFENNLL	Ad9	
338	QTMRR	FVT	CADGN	CHTLKTVHIVSHSRHC	WPVCDHNMF	Ad12	
338	---	SQLLT	CADGN	CQALRVFHVVSHPRR	PWPVFEHNML	Ad40	
355	ERGYQ	MLT	CAGGN	SHMLATVHVASHARK	PWPEFEHNVM	Ad4	
351	ERPYQ	MLT	CAGGH	CNMLATVHIVSHQ	RKKWPVFDHNVL	Ad35	
391	TR	CSL	HLGNRRGVFLPYQCNLSHTKIL	LEPESMSKVN	L	Ad5	
390	IK	CHM	HLGARRGTFQPYQCNFSQTKLL	LENDAFSRVN	L	Ad9	
376	MR	CTI	HLGLRRGMFRPSQCNF	SHSNIMLEPEVFSRVCL		Ad12	
373	MR	CTV	HLGARRGMFSPYQSNFCHTKVLMETDAFSRV	WW		Ad40	
393	TR	CNM	HLGSRRGMFMPYQCNLNYVKVL	LEPDAMSRVSL		Ad4	
389	TK	CTM	HAGRRGMFMPYQCNMNHVKVL	LEPDAFSRMSL		Ad35	
429	NGVFD	MTMKIWKVLR	Y-DETR	TRCRP	CECGGKH	IRNQP	Ad5
428	NGIFD	MDVSVYKILR	Y-DETK	SRVRA	CECGGRH	TRMQP	Ad9
414	NGVFD	LSVELCKVIRYND	DDTRHRCRQ	CECGSSHLELRP			Ad12
411	NGVFD	LTMELFKVVR	Y-DESK	VRCRP	CECGANH	IRLYP	Ad40
431	TGVFD	MNVEVWKILR	Y-DESK	TRCRA	CECGGKH	ARFQP	Ad4
427	TGIFD	MNTQIWKILR	Y-DDTR	SRVRA	CECGGKH	ARFQP	Ad35

Abb. 5 Aminosäurevergleich des E1B-55kDa-Proteins verschiedener Serotypen.

Dargestellt sind die E1B-55kDa-Aminosäuresequenzen aller bekannter Subgenera humaner Adenoviren mit jeweils einem Vertreter (Ad4, Gruppe E; Ad5, Gruppe C; Ad9, Gruppe D; Ad12, Gruppe A; Ad35, Gruppe B und Ad40, Gruppe F). Konservierte Bereiche sind grau unterlegt. Die Aminosäuren, welche dem sehr variablen Ringfinger-Motiv entsprechen könnten, sind rot gekennzeichnet.

Durch die Vergleiche konnten zwei hochkonservierte Motive identifiziert werden. Dabei handelte es sich zum einen um das sog. BC-Box-Motiv mit der Konsensussequenz [A,P,S,T]LXXXCXXX[A,I,L,V] (Abb. 4), an das über Elongin C der Elongin BC-Komplex binden könnte. Für diesen Komplex wurde gezeigt, dass er als Regulator des RNA-Polymerase II Elongationsfaktors Elongin A dient und somit maßgeblichen Einfluss auf die mRNA-Synthese hat (zur Übersicht: Reines *et al.*, 1999). Elongin BC ist zusätzlich ein Bestandteil des Großen von Hippel-Lindau (VHL) Tumorsuppressorkomplexes, welcher als E3 Ubiquitin-Ligase fungiert und für die selektive proteosomale Degradation bestimmter Zielproteine (z.B. HIF1 und HIF2) verantwortlich ist (Duan *et al.*, 1995; Kibel *et al.*, 1995; Maxwell *et al.*, 1999; Cockman *et al.*, 2000; Kamura *et al.*, 2000; Ohh *et al.*, 2000).

Der zweite Bereich (Abb. 5) fiel besonders durch die hohe Anzahl an konservierten Cysteinen (C) und Histidinen (H) auf. Auch die schnell wachsende Gruppe der Ringfinger-Proteine enthält auffällig viele konservierte Cysteine und Histidine und das Ringfinger-Motiv wird bisher durch das viermalige Auftreten eines Dupletts aus Cysteinen und Histidinen charakterisiert. Über die Bindung von zwei Zinkatomen wird diese Domäne räumlich koordiniert (Abb. 6). Ringfinger-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Entwicklung, Onkogenese, Apoptose und bei der viralen Replikation (zur Übersicht: Saurin *et al.*, 1996; Borden, 2000; Jackson *et al.*, 2000).

Da die einzelnen Dupletts unterschiedlich weit voneinander entfernt sind, ist das Ringfinger-Motiv sehr variabel. Auch das einzelne Metall-Bindestellen durch Asparagin und Threonin ersetzt sein können, trägt zur Heterogenität dieses Motivs bei. Somit lag die Vermutung nahe, dass es sich im E1B-55kDa ebenfalls um ein derartiges Motiv handeln könnte. Gerade in Bezug auf die vielfältigen Funktionen von E1B-55kDa, die mit der Manipulation zellulärer Prozesse einhergehen, wird die

Wichtigkeit dieses postulierten Motivs unterstrichen. Dies sollte mit Hilfe von E1B-Punktmutanten überprüft werden.

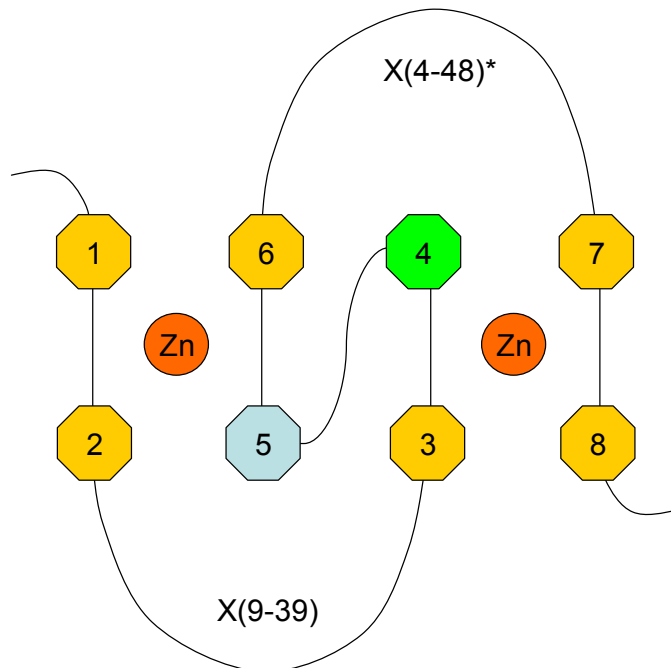


Abb. 6 Schematische Darstellung der Ringfinger-Domäne.

Die acht Positionen des Motivs bestehen aus angeordneten Cysteinen (orange) und Histidinen (grün). Die Position 5 kann entweder ein Cystein in Ring-HC Domänen oder ein Histidin in Ring-H2 Domänen sein. Der Abstand zwischen den Dupletts ist relativ variabel und ist in Klammern angegeben. Der Stern (*) bei X(4-48) zeigt an, dass es wahrscheinlich zwei neue Mitglieder der Ring-Familie gibt (UIP28 und UIP48) die an dieser Stelle ein größeres Insert tragen. In anderen Fällen können Metall-Bindestellen durch Asparagin (N) oder Threonin (T) ersetzt sein (nach Borden, 2000).

5.1.2 Konstruktion von E1B-55kDa-Mutanten

Die Herstellung der E1B-Punktmutanten erfolgte mit Hilfe des *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit* der Firma Stratagene unter Verwendung der unter 3.3.1 aufgeführten Oligonukleotide. Als Matrize diente pcDNA3-E1B-55kDa. Bei der Herstellung der BC-Box-Mutante L180PC184F sollte das Motiv durch eine bereits beschriebene Mutation zerstört werden (Kamura *et al.*, 1998). Um auszuschließen, dass eine zu stark veränderte Sekundärstruktur für mögliche Defekte im E1B verantwortlich ist, wurde die Mutante L180AC184S konstruiert. Analysen der Kristallstruktur des VHL-Elongin BC-Komplexes ergaben, dass die Bindung von Elongin BC an die BC-Box durch die Interaktion des hochkonservierten Leucins an Position zwei des Konsensusmotivs mit einer hydrophoben Tasche im Elongin C determiniert ist (Stebbins *et al.*, 1999). Deshalb sollte auch der Effekt der natürlichen Substitution des konservierten Cysteinrests an Position sechs durch ein Threonin (wie in Ad40) mit der Mutante C184T untersucht werden.

Mutationen im putativen Ringfinger-Motiv wurden an den rot markierten Cysteinen und Histidinen (Abb. 5) eingeführt. Um die Beeinträchtigung der Sekundärstruktur möglichst gering zu halten, wurden dabei Cysteinreste durch Serine und Histidinreste durch Leucine ersetzt. Die generierten Punktmutanten wurden bzgl. ihrer Lage und ihres Austausches als C283SC288S, H344LC347S, C361S, H373LH377L, C393SH396L und C454SC456S benannt. Die erhaltenen Klone wurden durch Sequenzierung überprüft (4.4.9) und der Einfachheit halber wie in Abb. 7 abgekürzt.

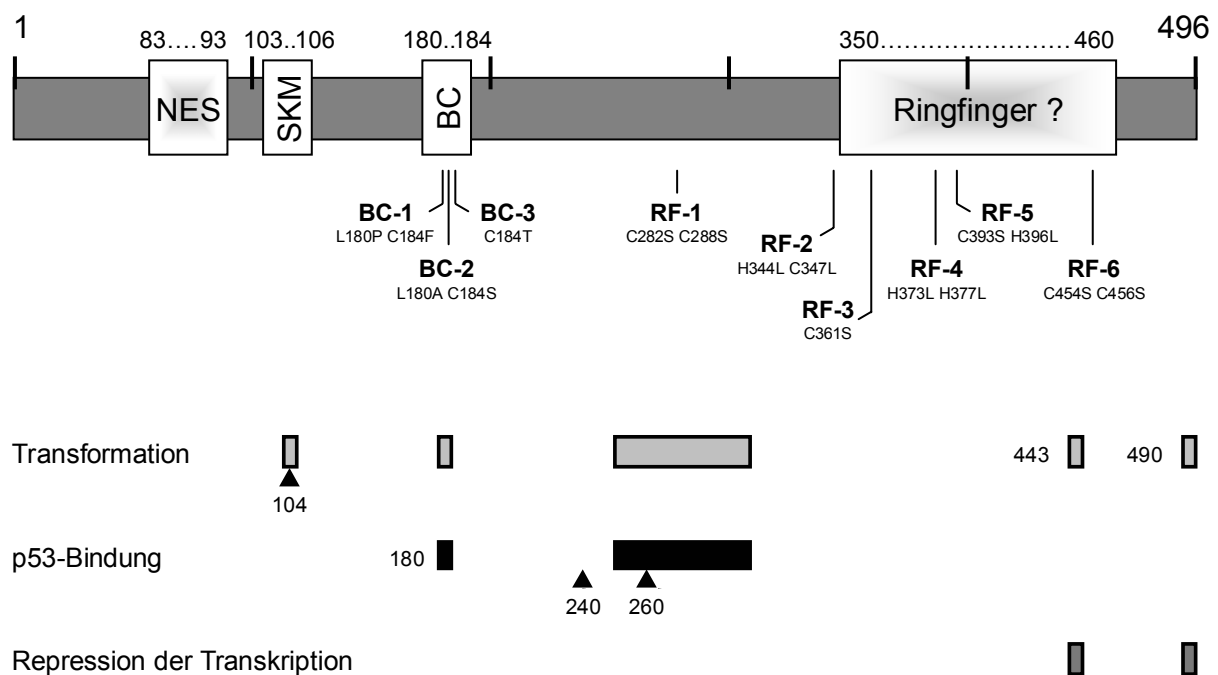


Abb. 7 Schematische Darstellung der eingeführten Punktmutationen und bereits bekannter funktioneller Bereiche im E1B-55kDa.

Als grauer Kasten ist das vollständige E1B-Protein von Aminosäure 1 bis 496 dargestellt. In den hellen überlagerten Kästen sind wichtige Motive im E1B mit der genauen Lage der entsprechenden Aminosäuren angegeben. Die Beschriftung im mittleren Teil der Darstellung gibt die Kurzbezeichnung der veränderten E1B-Proteine mit Lage und Art der Mutation an. Unten sind bereits bekannte, für die Transformation, p53-Bindung und Repression der Transkription wichtige Bereiche im E1B angegeben. NES, nukleäres Exportsignal; SKM, SUMO-Konjugationsmotiv; BC, BC-Box; Ringfinger?, putative Ringfinger-Region.

5.1.3 Analysen zum transformierenden Potenzial der E1B-Mutanten

Bei Transformationsexperimenten macht man sich die grundlegende Eigenschaft primärer Zellen zunutze, sich nur begrenzt teilen zu können. Im Gegensatz zu unbegrenzt wachsenden Tumorzellen stellen primäre Zellen nach einer gewissen Anzahl von Teilungen das Wachstum ein und erreichen einen Zustand replikativer Seneszenz (Hayflick, 1965). Dieser Wachstumsstopp kann jedoch durch Inkubation der Zellen mit transformierenden Agenzien (oder durch die Akkumulation spontaner Mutationen) überwunden werden. In diesem Fall wachsen einzelne transformierte Zellen zu mehrschichtigen Kolonien (*Foci*) heran, welche nach 2 – 3 Wochen makroskopisch beobachtet werden können. Die transformierten Zellen sind neben der Fähigkeit zu unbegrenztem Wachstum auch durch den Verlust der Kontaktinhibition und verminderter Serumabhängigkeit gekennzeichnet.

Für alle untersuchten Vertreter der Gruppe der Adenoviren konnte gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, primäre Rattenzellen in Zellkultur zu transformieren. Diese Eigenschaft wurde anfangs allein den Genprodukten der frühen Region 1A und 1B (E1A und E1B) zugeschrieben (zur Übersicht: Bernards und van der Eb, 1984; Graham, 1984; Shenk, 1996), konnten allerdings später um die Genprodukte E4orf3 (Täuber, 1998; Nevels *et al.*, 1999b) und E4orf6 (Nevels *et al.*, 1999a) ergänzt werden.

5.1.3.1 Untersuchung der Transformation in Kooperation mit E1A

Um die Effekte der gezielten Mutationen auf die transformationssteigernde Wirkung von E1B in Kombination mit E1A zu untersuchen, wurden die E1B-Mutanten in Transformationsversuchen getestet (4.2.4). Nach vier Wochen wurden die entstandenen Zellklone mit Kristallviolett angefärbt und ausgezählt (Abb. 8). Die *Foci* aus jeweils einer Schale wurden nicht gefärbt, sondern mit G418 selektioniert und als stabile Zelllinien etabliert (vgl. 4.2.5).

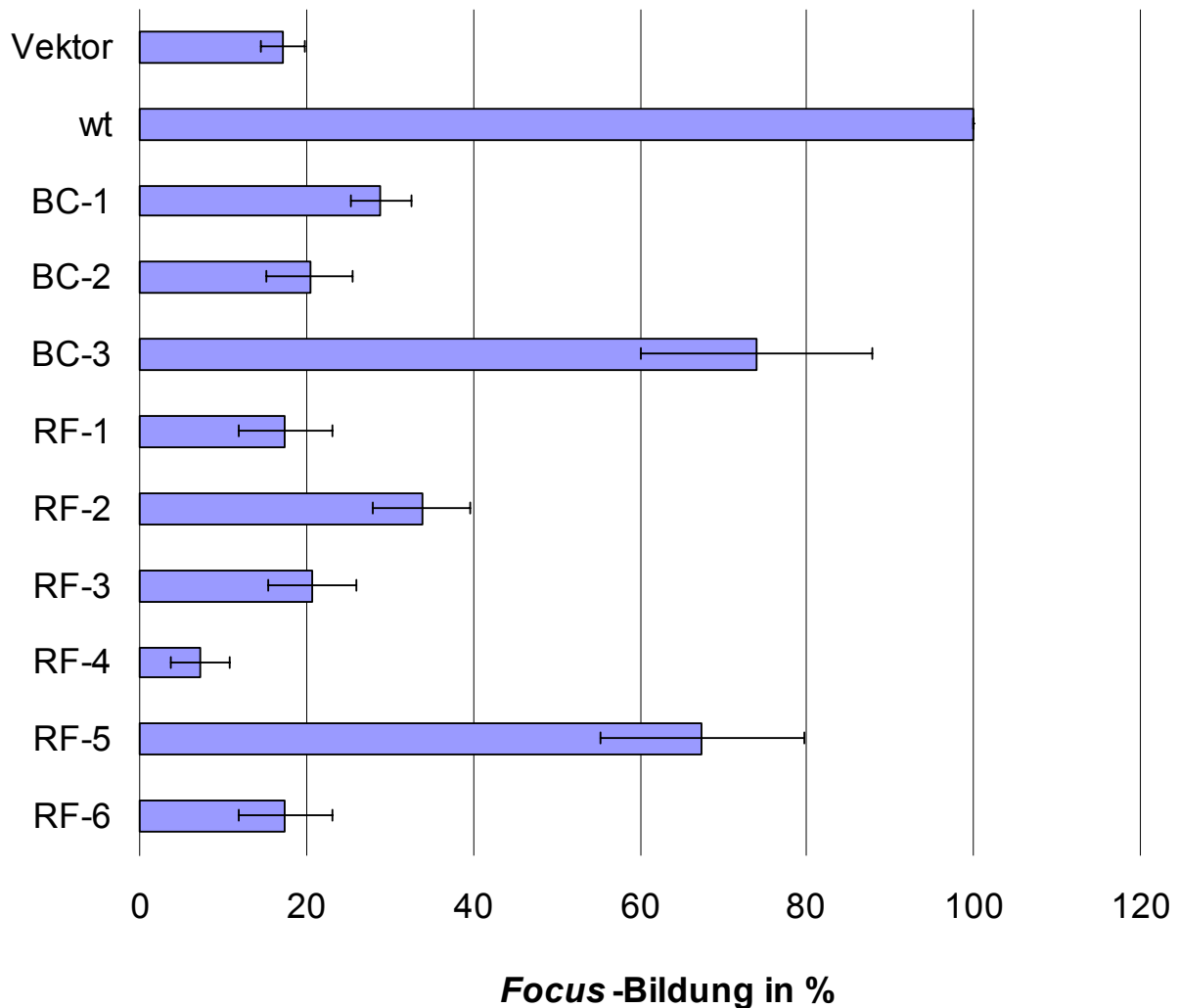


Abb. 8 Transformationsversuche zur Kooperation der E1B-55kDa-Mutanten mit E1A.

Primäre Rattennierenzellen wurden jeweils mit 4 µg pE1A und zusätzlich mit 4 µg der angegebenen pcDNA3-E1B Konstrukte bzw. pcDNA3 alleine (Vektor) nach der Kalziumphosphat-Methode transfiziert (4.2.3.1). Nach vier Wochen wurden die entstandenen *Foci* angefärbt und ausgezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen, wobei die Positivkontrolle mit wt-E1B auf 100 % normiert wurde. Die verschiedenen E1B-Mutanten wurden wie in Abb. 7 dargestellt benannt.

Mit diesen Versuchen konnte das transformierende Potenzial von E1A alleine bestätigt werden (Abb. 8, Vektor), welches in Kooperation mit wt-E1B-55kDa deutlich gesteigert wird (Abb. 8, wt). Bei den Mutanten BC-3 und RF-5 war eine geringe Reduktion der *Focus*-Bildung festzustellen. Ihre Fähigkeit in Kooperation mit E1A *Foci* auszubilden war bei ca. 70 % (Abb. 8, BC-3 und RF-5). Ein dramatischer Rückgang der *Focus*-Bildung konnte bei den BC-Box-Mutanten BC-1 und BC-2 sowie den putativen Ringfinger-Mutanten RF-1, RF-2, RF-3 und RF-6 nachgewiesen werden. Ein negativer Effekt auf die *Focus*-Bildung unter dem Wert der

Vektorkontrolle war bei RF-4 zu beobachten. Bei gleichzeitiger Transfektion dieser Mutante mit E1A konnte nur etwa die Hälfte der *Foci* detektiert werden als mit E1A alleine. Mit Ausnahme von BC-3 und RF-5 waren also alle Mutanten deutlich in ihrer Aktivität eingeschränkt, die E1A-induzierte onkogene Transformation primärer Rattennierenzellen zu stimulieren.

5.1.3.2 Untersuchung der Transformation in Kooperation mit E1A und E4orf6

E1B-55kDa interagiert mit E4orf6 sowohl in infizierten als auch in transfizierten Zellen. Um die Effekte der Mutationen auf die transformationssteigernde Wirkung von E1B in Kombination mit E1A und E4orf6 zu untersuchen, wurden die E1B-Mutanten in Transformationsversuchen getestet (4.2.4). Nach drei Wochen wurden die entstandenen Zellklone mit Kristallviolett angefärbt und ausgezählt (Abb. 9). Die *Foci* aus jeweils einer Schale wurden nicht gefärbt, sondern mit G418 selektioniert und als stabile Zelllinien etabliert (vgl. 4.2.5).

Auch bei diesem Versuchsansatz wurde deutlich, dass wt-E1B-55kDa (Abb. 9, wt), verglichen mit der Vektorkontrolle E1A und E4orf6 (Abb. 9, Vektor), zu einer deutlichen Steigerung der *Focus*-Anzahl beiträgt. Die Anwesenheit von E4orf6 führte, im Vergleich zu E1A und E1B alleine, in etwa zu einer Verdoppelung der entstandenen *Foci* bei der Positivkontrolle (Abb. 8, wt).

Die Mutante BC-3 zeigte keine signifikante Änderung der *Focus*-Bildung im Vergleich zum wt (Abb. 9, BC-3). Auch RF-4 und RF-5 waren in Kooperation mit E1A und E4orf6 in der Lage vermehrt *Foci* auszubilden. Allerdings waren sie bereits deutlich in dieser Aktivität eingeschränkt und bildeten nur noch halb so viele *Foci* wie der wt (Abb. 9). Die restlichen Konstrukte waren nicht in der Lage die Anzahl der *Foci* signifikant zu erhöhen. Zu diesen zählten die BC-Box-Mutanten BC-1 und BC-2 sowie die potentiellen Ringfinger-Mutanten RF-1, RF-2, RF-3 und RF-6.

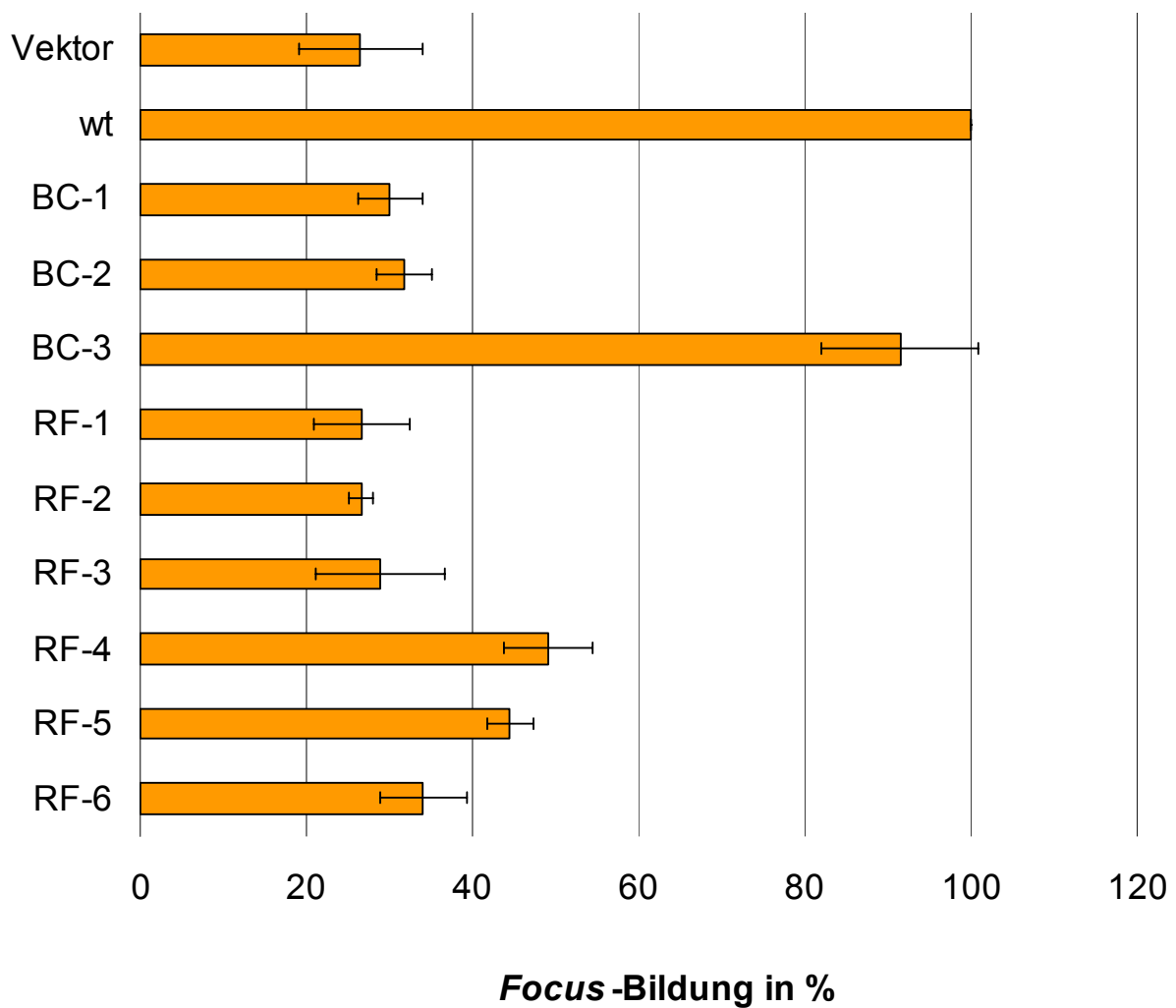


Abb. 9 Transformationsversuche zur Kooperation der E1B-55kDa-Mutanten mit E1A und E4orf6.

Primäre Rattennierenzellen wurden jeweils mit 4 µg pE1A, 1 µg pcDNA3-HA E4orf6 und zusätzlich mit 4 µg der angegebenen pcDNA3-E1B Konstrukte bzw. pcDNA3 alleine (Vektor) nach der Kalziumphosphat-Methode transfiziert (4.2.3.1). Nach drei Wochen wurden die entstandenen *Foci* angefärbt und ausgezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen, wobei die Positivkontrolle mit wt-E1B auf 100 % normiert wurde. Die verschiedenen E1B-Mutanten wurden wie in Abb. 7 dargestellt benannt.

5.1.4 Nachweis von E1A und E1B in stabil transformierten Zelllinien

Die bei 5.1.3.1 und 5.1.3.2 mit G418 selektierten und etablierten Zelllinien wurden auf die Expression der adenoviralen Genprodukte E1A und E1B-55kDa überprüft. Für die Zelllinien wurde, basierend auf den ursprünglich transfizierten Plasmiden folgende Nomenklatur verwendet: A für transfiziertes E1A, B für E1B und S für E4orf6 (six). Der Nachweis von E1A und E1B erfolgte mittels *Western Blot*-Analysen (4.5.6) und ist in Abb. 10 dargestellt.

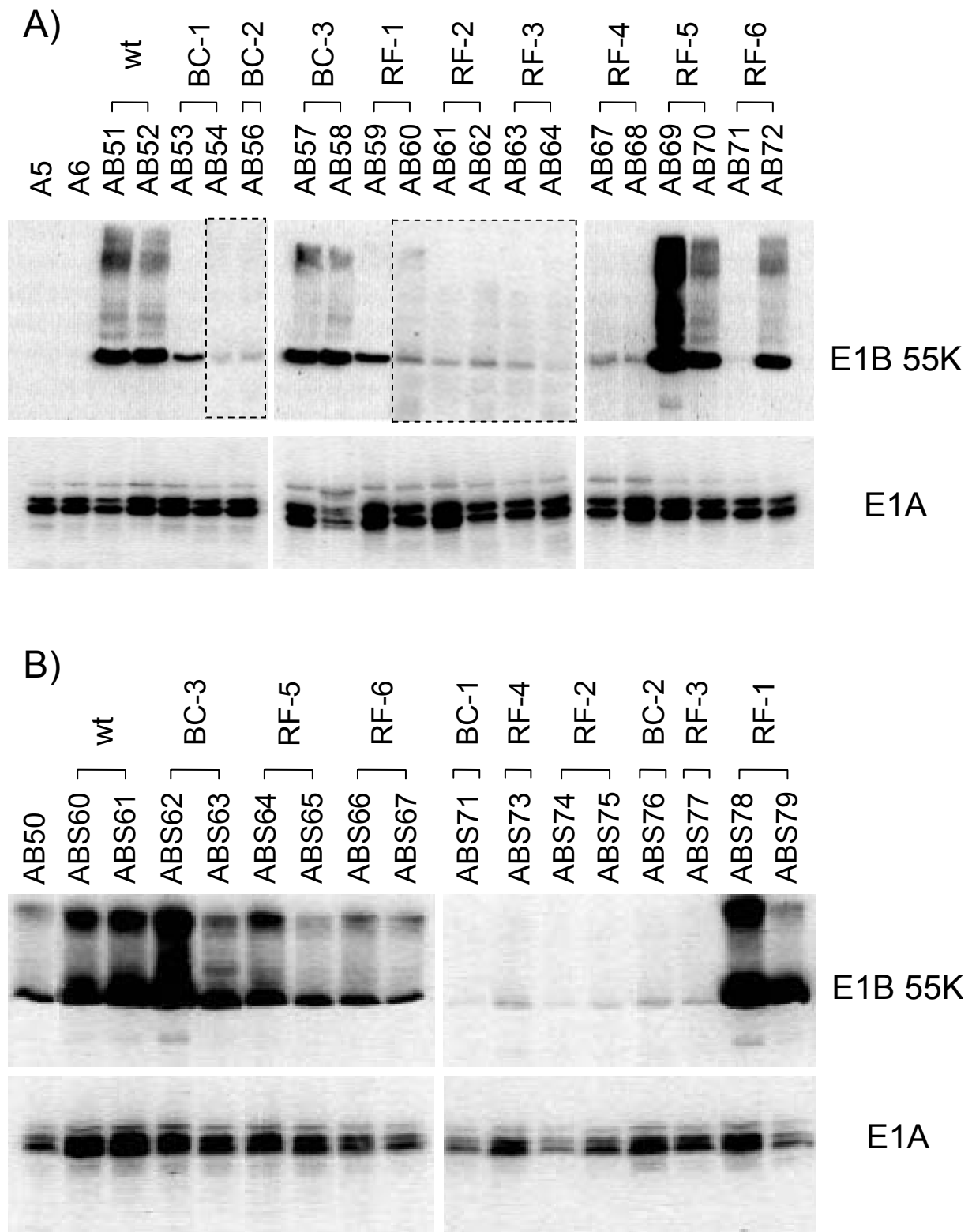


Abb. 10 Nachweis adenoviraler Proteine in etablierten BRK-Zelllinien.

Je 50 µg Gesamtzellextrakt wurden über 12 %ige SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und über *Western Blot*-Analyse detektiert. Der Nachweis erfolgte mit den Antikörpern anti-E1B-55kDa 2A6 und anti-E1A M73. Die Beschriftung über den eckigen Klammern gibt die Position der Mutation im E1B-55kDa-Polypeptid an. (A) Darstellung der Zelllinien transformiert mit E1A und E1B; mit gestrichelter Linie umrandete *Blot*-Ausschnitte wurden länger exponiert; (B) Darstellung der Zelllinien transformiert mit E1A, E1B-55kDa und E4orf6.

In allen getesteten Zelllinien konnte E1A in großen Mengen nachgewiesen werden (Abb. 10 A und B). Auch die verschiedenen E1B-Proteine waren vorhanden, wobei sich der Expressionsgrad teilweise stark unterschied. Sowohl in den AB- als auch in den ABS-Zellen war durchgehend ein sehr starkes Signal für wt, BC-3 und RF-5 detektierbar (Abb. 10 A und B). RF-1 und RF-6 waren in AB-Zellen jeweils in einer (Abb. 10 A, AB59 und AB72), in ABS-Zellen in beiden Linien (Abb. 10 B, ABS66 und ABS67 bzw. ABS78 und ABS79) deutlich nachweisbar. In AB53 konnte die Expression von BC-1 gezeigt werden, wobei die entsprechende zweite AB-Zelllinie (Abb. 10 A, AB54), als auch die vergleichbare ABS-Zelllinie (Abb. 10 B, ABS71), das adenovirale Proteine nur in sehr kleinen Mengen enthielt. Alle anderen mutierten E1B-Proteine (BC-2, RF-2, RF-3 und RF-4) waren, sowohl mit (Abb. 10 B) als auch ohne E4orf6 (Abb. 10 A), nur in sehr geringen Gleichgewichtsmengen vorhanden. Der unterschiedliche Grad der Expression könnte auf eine veränderte Stabilität der mutierten Proteine hindeuten. Gerade die Proteine mit Mutationen im zentralen Bereich (RF-2, RF-3 und RF-4) waren am stärksten betroffen. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass Mutationen in dieser Region generell zu einer erhöhten Instabilität des Proteins führen (Gonzalez und Flint, 2002).

5.1.5 Immunhistochemischer Nachweis von E1B in stabil transformierten AB-Zelllinien

E1B-55kDa ist ein nukleozytoplasmatisches Pendelprotein (Krätzer *et al.*, 2000; Dosch *et al.*, 2001; Endter *et al.*, 2001) das in wt Ad5-infizierten Zellen ein komplexes Verteilungsmuster im Zytoplasma und im Zellkern aufweist (Ornelles und Shenk, 1991; Smiley *et al.*, 1995). Zu späten Zeitpunkten der Infektion befindet es sich zum Teil diffus im Zytoplasma verteilt und in einem kernständigen Komplex (*perinuclear body*), wobei der größte Teil im Kern lokalisiert ist (Ornelles und Shenk, 1991). Im Gegensatz zu seiner nukleären Lokalisation in infizierten Zellen findet man E1B-55kDa in transient transfizierten und stabil transformierten Zellen primär im Zytoplasma und *perinuclear body* (Zantema *et al.*, 1985; Blair Zajdel und Blair, 1988; Orlando und Ornelles, 1999).

Ob die verschiedenen Mutationen einen Einfluss auf die Verteilung des adenoviralen Proteins in stabil transformierten BRK-Zelllinien haben wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen (4.5.8) untersucht (Abb. 11).

Wie für das wt-Protein (Abb. 11, a1 und a2) vorhergesagt ist E1B in den transformierten Zelllinien im Zytoplasma lokalisiert, wobei sich ein großer Teil im *perinuclear body* befindet. Ein gleiches Verteilungsmuster ist auch für BC-3 (Abb. 11, d1 und d2) zu beobachten. Die beiden weiteren BC-Box-Mutanten BC-1 (Abb. 11, b1 und b2) und BC-2 (Abb. 11, c1 und c2) sind ebenfalls diffus im Zytoplasma verteilt, sie unterscheiden sich jedoch deutlich von wt und BC-3 durch das Fehlen des perinukleären Kompartiments. Mutationen an den Aminosäurepositionen 180 und 184 im E1B-55kDa führen also zum Verlust der Lokalisation von E1B im *perinuclear body*. Eine einfache Substitution von Cystein 184 zu Threonin hingegen haben keinen Einfluss.

Im Gegensatz dazu verhalten sich alle Mutanten im putativen Ringfinger-Motiv prinzipiell wie das wt-Protein, indem sie eine Verteilung im Zytoplasma und *perinuclear body* zeigen. Interessanterweise scheinen die Veränderungen im Polypeptid jedoch die Integrität des perinukleären Körpers zu beeinflussen. Gerade bei den stark exprimierenden Mutanten RF-1 (Abb. 11, e1 und e2), RF-5 (Abb. 11, i1 und i2) und RF-6 (Abb. 11, j1 und j2) verliert er sein charakteristisches rundliches Aussehen und liegt teils keilförmig, teils abgeplattet an der zytoplasmatischen Seite der Kernmembran vor. Des weiteren findet man bei diesen Mutanten ein zum Teil sehr starkes Auseinanderbrechen dieser Struktur, was in der Existenz vieler kleinerer perinucleärer Strukturen resultiert. Für die Mutanten RF-2 (Abb. 11, f1 und f2), RF-3 (Abb. 11, g1 und g2) und RF-4 (Abb. 11, h1 und h2) kann wegen der geringen Expression diesbezüglich keine Aussage getroffen werden.

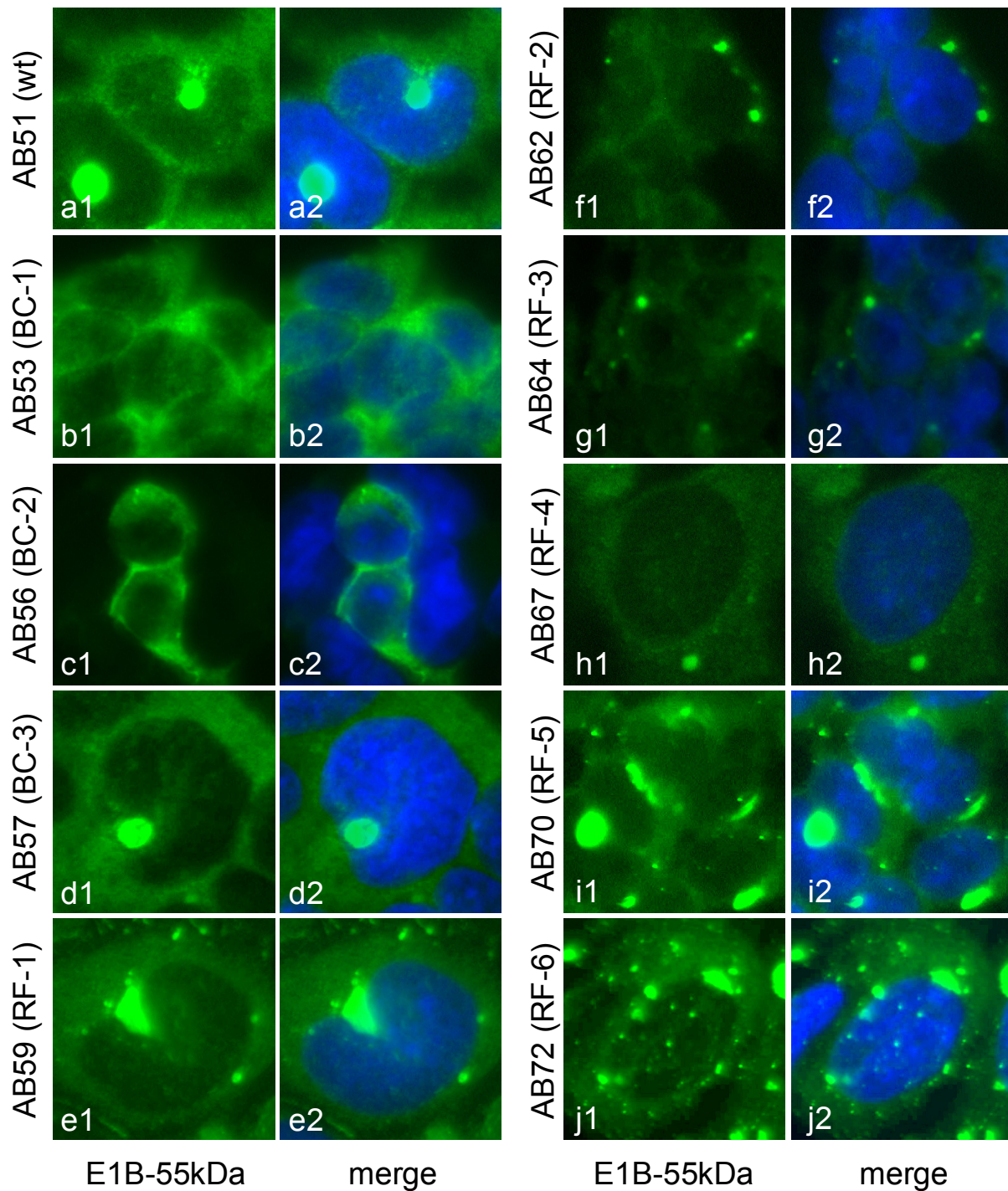


Abb. 11 Lokalisation und Expression der mutierten E1B-Polypeptide in AB-Zelllinien.

Bei einer Konfluenz von 50 – 70 % wurden die verschiedenen AB-Zelllinien mit Methanol fixiert (4.5.8.2) und anschließend mit dem E1B-55kDa spezifischen Antikörper 2A6 in einer 1:10 Verdünnung inkubiert. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgte mit einem FITC-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper (a1 – j1). Die Überlagerung von E1B (grün) mit der DAPI-Kernfärbung (blau) ist in a2 – j2 dargestellt. Die Beschriftung neben den Bildpaaren gibt den Namen der Zelllinie und die Abkürzung der Mutationen (laut Abb. 7) im E1B-55kDa-Polypeptid an. Vergrößerung 1000x.

5.1.6 Einfluss der Mutationen auf die Interaktion von E1B-55kDa mit p53

Das p53 Protein ist ein sequenzspezifischer DNA-bindender Transkriptionsfaktor, mit der Aufgabe auf eine große Bandbreite von Stresssignalen (z.B. DNA-Schäden, Hypoxia oder Aktivierung von Onkogenen) in Zellen zu reagieren (zur Übersicht: Levine, 1997). Nach Aktivierung (beispielsweise durch DNA-Schäden) steigt die Menge und Aktivität von p53 an und eine ganze Reihe von stromabwärts liegenden Zielgenen werden in hohen Raten transkribiert (zur Übersicht: Vogelstein *et al.*, 2000; Jin und Levine, 2001). Diese Gene wiederum initiieren Programme des Zellzyklusarrests, der Apoptose, der DNA-Reparatur oder der Antiangiogenese. Für einige Tumore konnte bereits gezeigt werden, dass unter all diesen von p53 induzierten zellulären Programmen die Apoptose eine zentrale Rolle für seine tumorsupprimierende Wirkung hat (Schmitt und Lowe, 2002).

E1B-55kDa wirkt den Effekten des Tumorsuppressors während der adenoviralen Infektion durch mindestens zwei Mechanismen entgegen. E1B-55kDa kann (i) die aminoternale saure Aktivierungsdomäne von p53 binden und direkt die p53-vermittelte Transkriptionsaktivierung reprimieren (Sarnow *et al.*, 1982a; Kao *et al.*, 1990; Yew und Berk, 1992; Yew *et al.*, 1994; Martin und Berk, 1998) und (ii) in Kombination mit E4orf6 die proteasomale Degradation von p53 stimulieren (Grand *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997; Querido *et al.*, 1997; Ridgway *et al.*, 1997; Steegenga *et al.*, 1998; Boyer und Ketner, 2000; Nevels *et al.*, 2000; Wienzek *et al.*, 2000).

5.1.6.1 Reporter-Versuche zur E1B-vermittelten Repression der p53-abhängigen Transkriptionsaktivierung

Als erstes wurde die Eigenschaft der E1B-Mutanten überprüft die p53-vermittelte Transkriptionsaktivierung zu reprimieren. Dazu wurden, wie unter 4.6 beschrieben, p53-negative H1299-Zellen mit einem p53-abhängigen Promotor (vor dem Luziferase-Gen), einem konstitutiv exprimierenden p53-Plasmid und den verschiedenen E1B-Plasmiden bzw. der Vektorkontrolle transfiziert und 24 h

inkubiert. Die Aktivität der Luziferase wurde anschließend luminometrisch bestimmt und die Messwerte mit der internen Kontrolle normalisiert (Abb. 12).

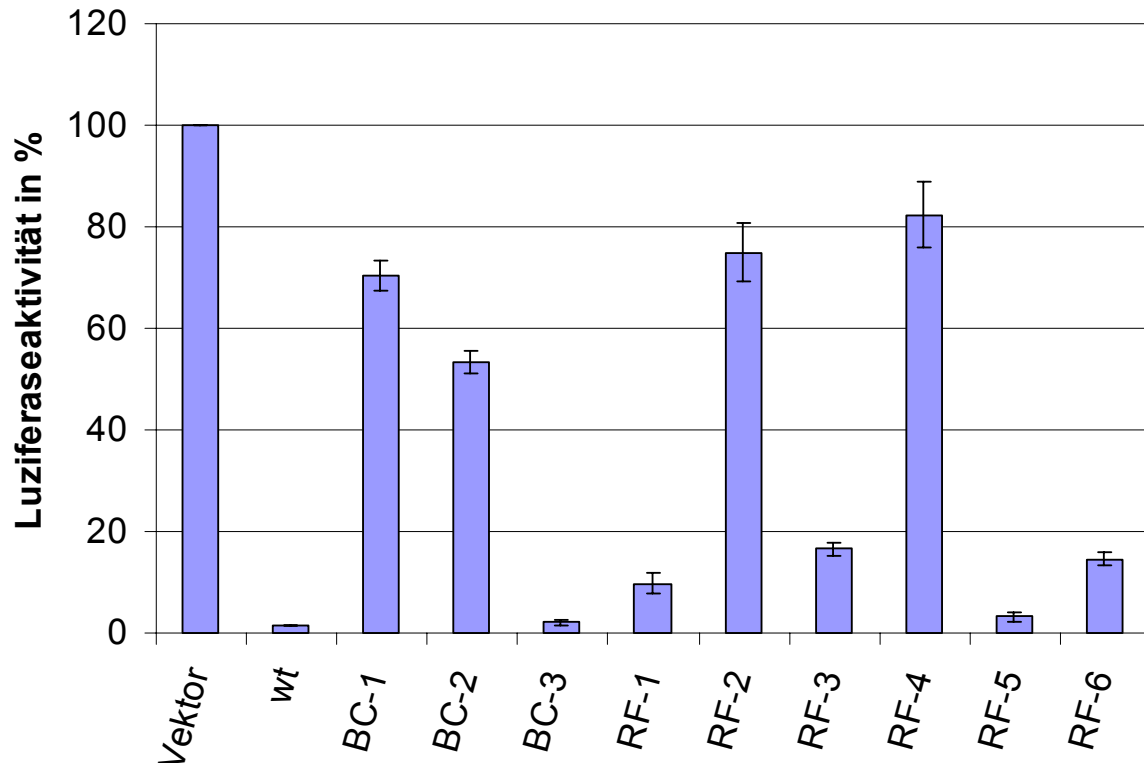


Abb. 12 Auswirkungen der verschiedenen E1B-55kDa-Varianten auf die p53-abhängige Transkriptionsaktivierung.

1×10^5 H1299-Zellen wurden in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (6-well Schale; Falcon) ausgesät und am nächsten Tag mit 0,1 μ g pRL-TK (interne Kontrolle), 0,25 μ g pRE-Luc (p53-abhängiger Promotor vor dem Luziferase-Gen), 25 ng pCMV-p53 und 1 μ g pcDNA3 (Vektor) bzw. pcDNA-E1B-Konstrukten transfiziert. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen wie bei 4.6 angegeben lysiert und zentrifugiert. Die Aktivität des p53-abhängigen Promotors wurde durch Messung der Luziferase-Menge luminometrisch bestimmt (*Dual-Luciferase Assay System*; Promega). Die im Kontrollansatz mit pcDNA3 gemessene Aktivität wurde auf 100 % normiert und als Basis zur Berechnung der E1B-Konstrukt-vermittelten Promotoraktivität verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen.

Das wt-E1B-Polypeptid kann fast vollständig die p53-vermittelte Transkriptionsaktivierung eines entsprechenden Promotorelementes unterbinden (Abb. 12, wt). Unter den gewählten Bedingungen war nur eine Restaktivität von ca. 1,5 % zu messen. Auch BC-3 und RF-5 (Abb. 12) konnten mit ähnlich hoher Effizienz diese Aktivität von p53 reprimieren (verbliebene Aktivität: 2 – 3 %). Ein leichter Einfluss konnte für die Mutanten RF-1, RF-3 und RF-6 festgestellt werden. Bei diesen war die

Menge an gebildeter Luziferase auf einen Wert von ungefähr 10 - 15 % reduziert. Sie waren also noch in der Lage die Aktivität von p53 deutlich zu reprimieren, wenn auch nicht vergleichbar stark wie das wt-Protein. Die verbleibenden Mutanten waren deutlich defekt in ihrer Eigenschaft der transkriptionsaktivierenden Wirkung von p53 entgegenzuwirken. Die BC-Box-Mutanten BC-2 und BC-1 konnten die p53-abhängige Promotoraktivität nur um 50 bzw. 30 % reduzieren, RF-2 und RF-4 ihrerseits nur noch um 25 bzw. 20 %. Verglichen mit der fast kompletten Repression der transaktivierenden Funktion von p53 durch das wt-Protein lässt dies auf schwerwiegende Defekte der entsprechenden Mutanten schließen.

5.1.6.2 E1B/E4orf6 vermittelte Destabilisierung von p53 in H1299-Zellen

Die zweite bedeutende Eigenschaft von E1B in Bezug auf das Tumorsuppressorprotein p53 ist seine Fähigkeit, in Kombination mit E4orf6, dessen proteasomale Degradierung zu stimulieren. Um diese Aktivität bei den generierten Punktmutanten zu überprüfen, wurden die verschiedenen E1B-Konstrukte mit und ohne E4orf6 in p53^{-/-} H1299-Zellen transfiziert. Zusätzlich wurde ein konstitutiv exprimierendes p53-Plasmids kotransfiziert und die Stabilität des Proteins mittels *Western Blot*-Analysen überprüft (Abb. 13).

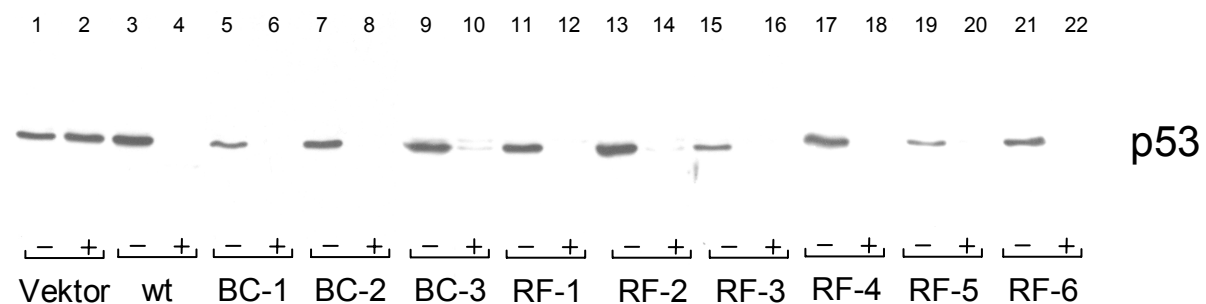


Abb. 13 Effekte der verschiedenen E1B-55kDa-Varianten auf die Gleichgewichtsmengen von p53.

3 x 10⁶ H1299-Zellen wurden in 100 mm-Zellkulturschalen ausgesät und am nächsten Tag mit 0,5 µg pCMV-p53 und 3 µg pcDNA3 (Vektor) bzw. pcDNA-E1B-Konstrukten transfiziert. Zusätzlich wurde zu den mit (+) gekennzeichneten Ansätzen 5 µg pcDNA3-HA E4orf6, zu den mit (-) gekennzeichneten 5 µg pcDNA3 hinzu transfiziert. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen wie bei 4.5.1 angegeben geerntet und lysiert. Zur Bestimmung der Menge an p53 wurden 20 µg Gesamtprotein durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels *Western Blot*-Analyse detektiert. Der Nachweis erfolgte mit dem Antikörper anti-p53 DO1. Eckige Klammern zeigen zusammengehörende Ansätze an und die Beschriftung gibt die Position der Mutation im E1B-55kDa-Polypeptid laut Abb. 7 an. Zusätzlich sind im oberen Teil der Abbildung die Spurnummern angegeben.

In den ersten beiden Spuren der Abb. 13 sind die Vektorkontrollen ohne und mit E4orf6 dargestellt. Wenn, wie in der ersten Spur, nur das p53-Plasmid transfiziert wurde, ist die Expression des Tumorsuppressorproteins unter den gewählten Bedingungen deutlich nachweisbar. Auch bei gleichzeitiger Expression von E4orf6 und p53 (Abb. 13, Spur 2) bleibt die Menge an p53 annähernd gleich. Dies bedeutet, dass E4orf6 alleine keinen deutlichen Effekt auf die Stabilität des Tumorsuppressorproteins hat. Wird hingegen das wt-E1B-Protein in Kombination mit p53 exprimiert (Abb. 13, Spur 3) führt dies zu einer Stabilisierung von p53 und erhöhte Gleichgewichtsmengen sind mit diesem Test nachweisbar. Werden jedoch p53, E4orf6 und E1B-wt gleichzeitig exprimiert (Abb. 13, Spur 4) führt dies zum vollständigen Abbau des p53-Polypeptids. Mit dem so entwickelten System konnten beide Eigenschaften der E1B-Punktmutanten überprüft werden: (i) führt die Expression von E1B und p53 zur Stabilisierung des Tumorsuppressorproteins und (ii) sind E1B und E4orf6 in der Lage p53 zu degradieren.

Bei den Untersuchungen stellte sich heraus, dass alle E1B-Mutanten in der Lage waren p53 in Kooperation mit E4orf6 zu destabilisieren (Abb. 13, Spuren 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22). Dies führte zu der Annahme, dass alle E1B-Konstrukte zum einen in ausreichender Menge vorhanden waren und zum anderen in der Lage waren p53 bei gleichzeitiger Anwesenheit von E4orf6 zu binden und zu degradieren.

Da alle Punktmutanten in der Lage waren p53 zu binden, sollten sie auch im Gegenzug, bei Abwesenheit von E4orf6, zur Stabilisierung von p53 beitragen. Interessanterweise ergaben sich hierbei jedoch deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Mutanten. Wie das wt-Protein verhielten sich in diesem Experiment nur BC-3, RF-2 und RF-4 (Abb. 13, Spuren 9, 13 und 17). Auch für BC-2, RF-1 und RF-6 (Abb. 13, Spuren 7, 11 und 21) war eine Stabilisierung von p53 zu beobachten, wenn auch nicht in dem Maße wie mit dem unveränderten E1B-55kDa. Einen kompletten Verlust dieser Aktivität zeigten BC-1, RF-3 und RF-5 (Abb. 13, Spuren 5, 15 und 19). Bei diesen kam es zu keiner Erhöhung der Gleichgewichtsmengen von p53 bei Kotretransfektion mit den E1B-Varianten. Lediglich Proteinmengen wie bei der Vektorkontrolle (Abb. 13, Spur 1) konnten detektiert werden.

5.1.7 Zusammenfassung der Ergebnisse der Transformationsversuche

Zusammenfassend konnten durch die im Abschnitt 5.1 durchgeführten Experimente neue Motive im E1B-55kDa identifiziert und bezüglich ihres transformierenden Potenzials, ihrer Expression und Lokalisation und ihrer Interaktion mit p53 charakterisiert werden.

Auf Grund der Fülle der Ergebnisse sind der besseren Übersichtlichkeit halber die gewonnen Daten hier schematisch (Abb. 14) und tabellarisch zusammengefasst (Tab. 2).

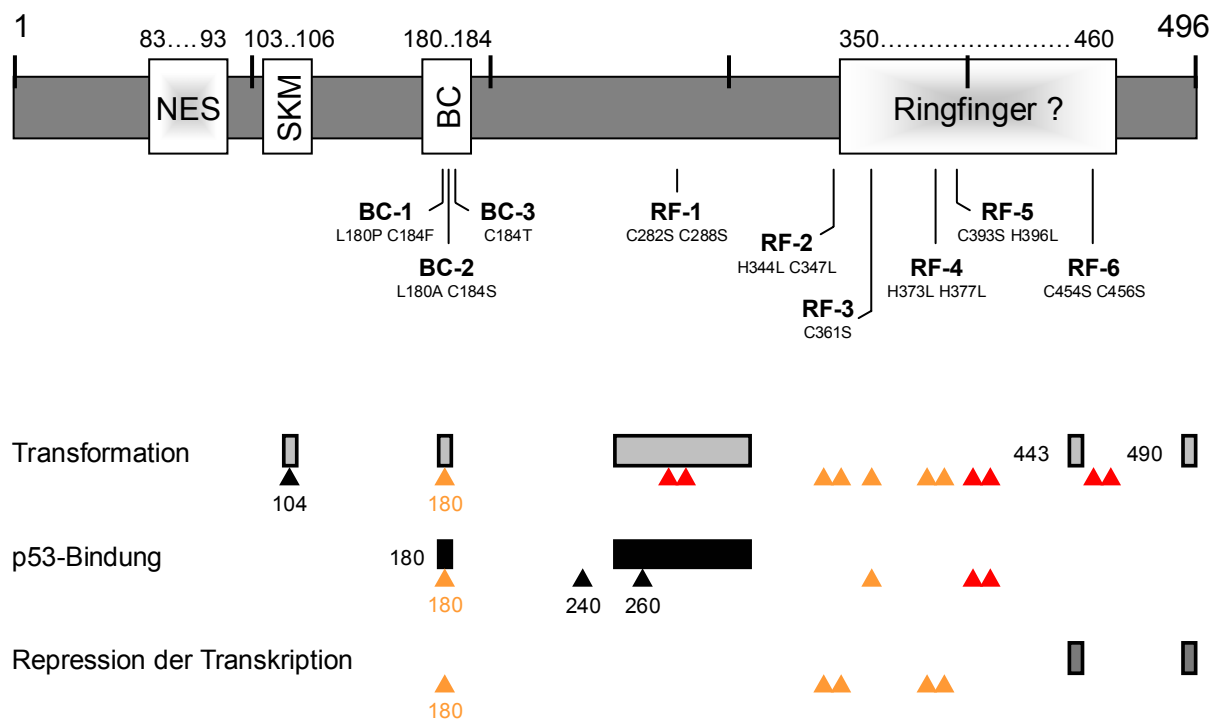


Abb. 14 Schematischer Darstellung der Ergebnisse der Transformationsversuche.

Analog zur Abb. 7 ist oben das E1B-Protein mit wichtigen Motiven und den Positionen der verschiedenen Proteinmutanten dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung sind als graue und schwarze Kästen die bekannten, für die Transformation, p53-Bindung und Repression der Transkription wichtigen Bereichen von E1B angegeben. Zusätzlich zu diesen sind als farbige Dreiecke diejenigen E1B-Mutanten hervorgehoben, die zum Verlust der jeweiligen Aktivität führen. Dabei wurden schwach exprimierte E1B-Mutanten orange, stark exprimierte rot dargestellt. NES, nukleäres Exportsignal; SKM, SUMO-Konjugationsmotiv; BC, BC-Box; Ringfinger?, putative Ringfinger-Region.

Transformierendes Potenzial in Kooperation mit			Stabile BRK-Zelllinien					Interaktion mit p53		
E1A	E1A E4orf6	E1A	Nachweis im WB		Lokalisation von E1B in IF			p53-abh. Promotoraktivität reduziert auf	Stabilisierung von p53 ohne E4orf6	p53-Degradation in Kooperation mit E4orf6
			E1B		Zyto-plasma	pnb	Anzahl pnb			
Vektor	17 %	26 %	+++	-				100 %	-	-
wt	100 %	100 %	+++	+++	+++	+++	1	1,4 %	+++	+++
BC-1	29 %	30 %	+++	+/-	+++	-	0	70,4 %	-	+++
BC-2	20 %	32 %	+++	+/-	+++	-	0	53,2 %	+	+++
BC-3	74 %	91 %	+++	+++	+++	+++	1	2,1 %	+++	+++
RF-1	17 %	27 %	+++	+++	+++	+++	> 1	9,7 %	++	+++
RF-2	34 %	27 %	+++	+/-	+	+	(1)	74,8 %	+++	+++
RF-3	21 %	29 %	+++	+/-	+	+	(1)	16,5 %	-	+++
RF-4	7 %	49 %	+++	+	+	+	(1)	82,3 %	++	+++
RF-5	67 %	45 %	+++	+++	+++	+++	> 1	3,1 %	-	+++
RF-6	17 %	34 %	+++	++	+++	+++	> 1	14,6 %	++	+++

Tab. 2 Zusammenstellung der Ergebnisse der Mutationsanalyse mit den verschiedenen E1B 55 kDa-Varianten.
In der ersten Spalte sind die Namen der verschiedenen E1B-Mutanten angegeben. Spalten zwei und drei zeigen das transformierende Potenzial der verschiedenen E1B-Varianten in primären BRK-Zellen, wobei in Spalte 2 (E1A) die kooperierende Wirkung von E1A und E1B und in Spalte 3 (E1A, E4orf6) die von E1A, E1B und E4orf6 (six) angegeben ist. Die Spalten 4 bis 8 fassen die Ergebnisse der stabil transformierten Zelllinien zusammen. Mit *Western Blot*-Analysen wurde die Expression von E1A (Spalte 4) und E1B (Spalte 5) überprüft, und mit Immunfluoreszenzanalysen wurde die Lokalisation von E1B im Zytoplasma bzw. im *perinuclear body* (pnb) bestimmt (Spalten 6 und 7). Zusätzlich wurde die Anzahl der schwachen Expression von E1B kann das Vorhandensein bedeutet in diesem Zusammenhang, dass ein deutlicher *p.n.b.* gesehen wurde; auf Grund der schwachen Expression von E1B kann das Vorhandensein weiterer *pnb* allerdings nicht ausgeschlossen werden. Die letzten drei Spalten (9 bis 11) fassen die Ergebnisse der Wechselwirkungen der E1B-Varianten mit dem Tumorsuppressorprotein p53 in H1299-Zellen zusammen. Die Reduktion der p53-abhängigen Promotor-Aktivierung durch die verschiedenen 55 K-Proteine ist in Spalte 9 dargestellt. Spalte 10 beschreibt die Wirkung der Polypeptide auf die Stabilisierung von p53 in Abwesenheit von E4orf6 und Spalte 11 die Degradation von p53 in Kooperation mit E4orf6. Symbole: +++, sehr stark; ++, leicht reduziert; +, stark reduziert; +/-, kaum messbar; -, nicht detektierbar.

5.2 Untersuchungen zur Wirkung gezielter Mutationen im E1B-55kDa-Protein im Kontext der Virusinfektion

Durch die in Abschnitt 5.1 durchgeführte Mutationsanalyse konnten neue funktionell bedeutende Bereiche im E1B-55kDa herausgearbeitet werden. Veränderungen im BC-Box-Motiv und in der putativen Ringfinger-Domäne resultieren in Proteinen mit unterschiedlichen Defekten (vgl. Abb. 14 und Tab 2). Da E1B ein multifunktionelles Polypeptid mit einer Vielzahl von Funktionen während der frühen und der späten Phase der viralen Infektion ist, war es nun von großem Interesse die Auswirkungen der verschiedenen Austausche im viralen Kontext zu untersuchen.

Eine einfache Methode die Wirkung der Punktmutanten im viralen Kontext zu überprüfen ist das System der Transfektion-Infektion. Dabei wird ein Plasmid das für das punktmutierte E1B-Protein kodiert in die Zielzellen transfiziert und nach 24 h mit einem E1B-defizienten Adenovirus überinfiziert. Sicherlich können mit dieser Methode Auswirkungen der Mutationen abgeschätzt werden. Für genaue Aussagen ist das System jedoch nicht geeignet, da die Stöchiometrie der an den Reaktionen teilnehmenden Proteine nicht den natürlichen Bedingungen entspricht. Diese veränderten Mengenverhältnisse können den Ablauf der katalysierten Reaktion beeinflussen und somit zu fehlerhaften Schlussfolgerungen führen.

Der einzige Weg sichere Daten im viralen Kontext zu erhalten ist die Herstellung von Adenoviren, die die punktmutierten E1B-Proteine exprimieren. Nur so kann sichergestellt werden, dass die stöchiometrischen Bedingungen der Expression exakt eingehalten werden. Der Nachteil hierbei ist jedoch, dass die etablierten Systeme (Chartier *et al.*, 1996; He *et al.*, 1998) zur Herstellung von Adenoviursmutanten die homologe Rekombination in Bakterienzellen benutzen. Gerade die Verwendung eines rekombinationskompetenten *E. coli*-Stammes führt oftmals zu unerwünschten Veränderungen in der DNA-Sequenz (z.B. Deletionen) und zieht ein zeit- und kostenintensives Durchmustern der erhaltenen Klone nach sich.

Aus diesem Grund sollte ein System etabliert werden, mit dem es möglich war schnell und effizient Punktmutationen im adenoviralen Genom zu erzeugen.

5.2.1 Klonierungssystem zur Herstellung punktmutierter Adenoviren

Ein System zur Herstellung von gezielten Adenovirusmutanten sollte insbesondere zwei Voraussetzungen erfüllen: (i) es sollte schnell und einfach sein und (ii) es sollte nicht auf die Benutzung von rekombinationskompetenten Bakterien angewiesen sein. Um diese Vorgaben zu erreichen wurde in Zusammenarbeit mit Peter Groitl aus unserer Arbeitsgruppe ein System etabliert, bei dem die schnelle zielgerichtete Veränderung der E1-Region mit dem direkten Klonieren in das 36 kb große Ad5-Genom kombiniert wurde (Abb. 15).

Im ersten Schritt wurde aus dem sequenzierten Ad5-Bacmid (Primer vgl. 3.3.1) ein kleiner Bereich subkloniert der die E1-Region von Ad5 und den bakteriellen Vektoranteil enthielt (E1-Box). In die Sequenz der E1-Region (hier speziell E1B-55kDa) wurde dann die gewünschte Mutation mit Hilfe des *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kits* (Stratagene) eingeführt. Dieser Umweg über ein subkloniertes Teilfragment von Ad5 war nicht vermeidbar, da ein direktes Einführen der Mutation ins Ad5-Bacmid auf Grund der Größe des Bacmids nicht möglich ist. Als nächstes erfolgte die Rückklonierung der modifizierten E1-Box in das Ad5-Bacmid. Die ursprüngliche E1-Region des Ad5-Bacmids wurde durch Spaltung mit der Restriktionsendonuklease *SwaI* durch die veränderte E1-Box ersetzt. Als Ergebnis lag nun ein Ad5-Bacmid mit verändertem E1B-55kDa-Gen vor. Im Anschluss wurde das Bacmid mit *PacI* linearisiert und somit der bakterielle und der virale Anteil getrennt. Dann wurde die doppelsträngige Virus-DNA in die Ad5 E1-transformierte Helferzelllinie 911 transfiziert und die mutierten Viren wie in 4.3.1 beschrieben geerntet.

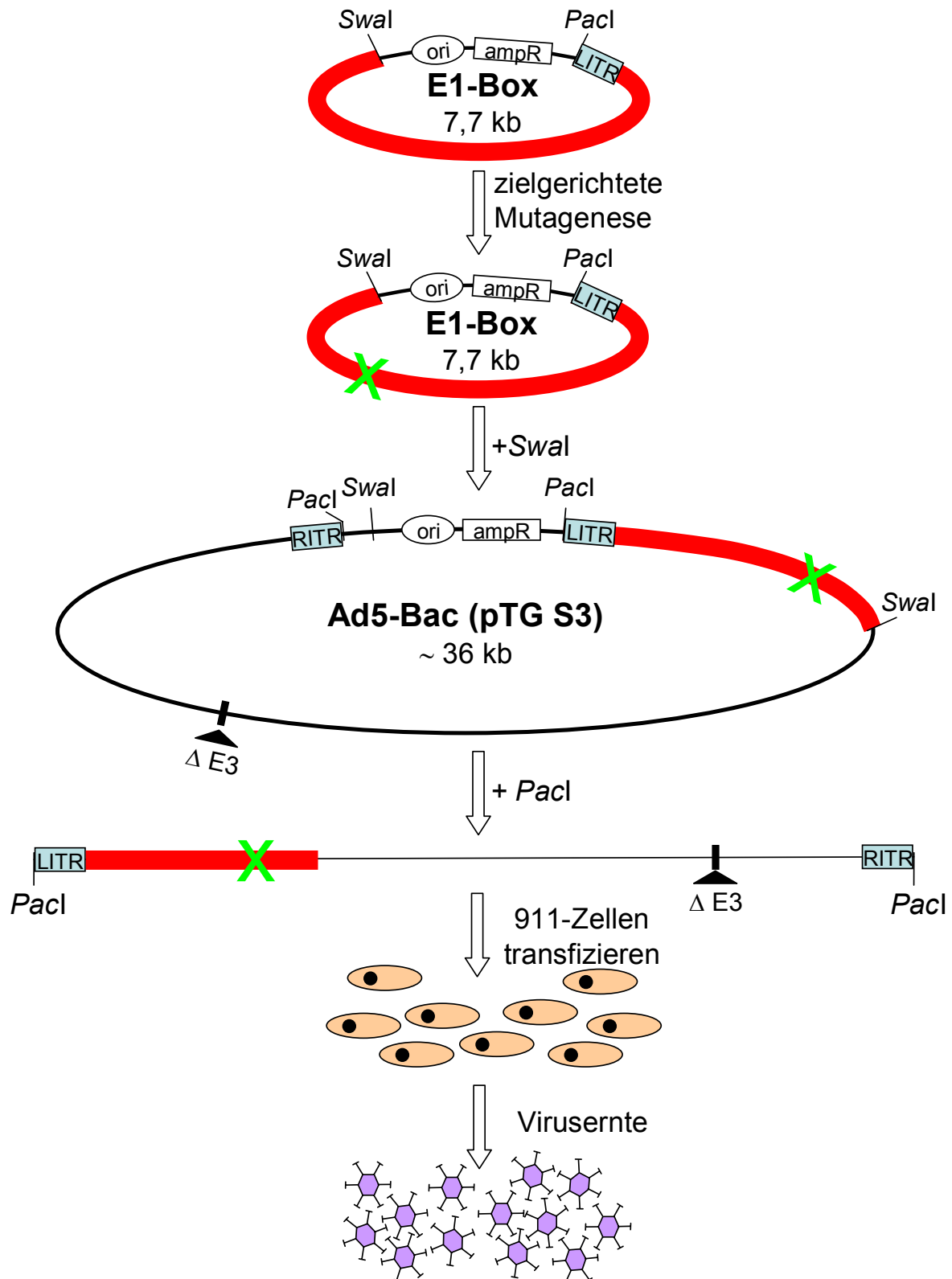


Abb. 15 Schema zur Herstellung von Ad5-Virusmutanten.

In die E1-Region (rot) der E1-Box wird mittels zielgerichteter Mutagenese eine Punktmutation (grünes X) eingeführt. Anschließend wird das mutierte Plasmid über *SwaI* in Ad5-Bac kloniert, mit *PacI* linearisiert und in die Helferzelllinie 911 transfiziert. Aus den Zellen konnten dann infektiöse Viruspartikel isoliert werden. LTR, left-hand inverted repeat; RITR, right-hand inverted repeat; $\Delta E3$, Deletion der early region 3 (E3); *ori*, origin of replication; *ampR*, Ampicillin-Resistenz.

5.2.2 Auswahl interessanter E1B-Polypeptide

Bei der Serie der BC-Box-Mutanten handelte es sich dabei um die Austausche BC-2 und BC-3 (Abb. 7 und 15). Für BC-2 sprach, dass dieses Polypeptid nicht im *perinuclear body* nachgewiesen werden konnte, dass es die p53-abhängige Promotoraktivierung nur auf die Hälfte reprimieren konnte und dass es die Stabilität von p53 nur mäßig steigern konnte. Interessanterweise wurde für die Virusmutante H180, mit einer vier Aminosäuren langen Linkerinsertion an dieser Stelle (Yew *et al.*, 1990), ein Defekt bei der Bindung des Tumorsuppressors festgestellt. Eine Verbindung zwischen der Lokalisation im perinukleären Kompartiment und der Fähigkeit p53 zu binden stellt die Virusmutante H260A her. Diese E1B-Mutante interagiert nur sehr schwach mit p53 (Shen *et al.*, 2001) und ist wie BC-2 nicht im perinukleären Kompartiment lokalisiert (diese Arbeit, Daten nicht gezeigt). Dies könnte auf eine mögliche Beteiligung der p53-Wechselwirkung und der Akkumulation von E1B in diesem Kompartiment hindeuten.

BC-3 wurde aus einem anderen Grund ausgewählt. Obwohl das zentrale Cystein im BC-Box-Motiv [A,P,S,T]LXXXCXXX[A,I,L,V] als konservierte Aminosäure beschrieben ist, verhielt sich das veränderte Protein wie das wt-Protein. Durch die Untersuchung der entsprechenden Virusmutante sollte ein Einfluss der Veränderung auf andere Funktionen von E1B-55kDa untersucht werden.

Für die weitere Untersuchung der putativen Ringfinger-Mutanten wurden RF-4 und RF-6 (Abb. 7 und 15) ausgewählt. An RF-4 war besonders auffällig, dass es die p53-abhängige Promotoraktivierung nur um $1/5$ reduzieren konnte, obwohl es das Tumorsuppressorprotein ebenso gut wie das wt-Protein stabilisieren konnte. Folglich konnte E1B das Tumorsuppressorprotein noch binden, jedoch nicht die Repression der Transaktivierung von p53 inhibieren. Dies deutete auf eine mögliche Beteiligung des putativen Ringfinger-Motivs an dieser Fähigkeit von E1B hin.

Von besonderem Interesse war die Untersuchung von RF-6. Zum ersten Mal konnte bei einer E1B-Mutante keine Korrelation zwischen dem transformierenden Potenzial und der Unterdrückung der p53-abhängigen Promotoraktivierung hergestellt

werden. Bisher galt, dass E1B durch seine p53-reprimierende Wirkung die E1A-induzierte p53-Akkumulation umgeht und so zu einer erhöhten Transformationsrate beiträgt. RF-6 ist jedoch nicht in seiner Wechselwirkung zu p53 defekt, kann aber trotzdem die E1A-induzierte Transformation nicht stimulieren. Dies lässt auf die Beteiligung weiterer Proteine am Transformationsprozess schließen. Mögliche Effekte auf den produktiven Infektionszyklus sollten mit einer entsprechenden Adenovirus-mutante überprüft werden (Abb. 16).

Zusätzlich zu diesen vier ausgewählten Mutationen wurden weitere Virusmutanten im E1B-55kDa hergestellt. Durch Mutationsanalysen am isolierten Protein konnte gezeigt werden, dass E1B ein nukleozytoplasmatisches Pendelprotein ist (Krätzer *et al.*, 2000; Endter *et al.*, 2001). Der nukleäre Export wird dabei durch ein leucinreiches nukleäres Exportsignal (NES) vom HIV Rev-Typ vermittelt. Eine effiziente Akkumulation des Proteins im Kern ist von der Konjugation des *small ubiquitin-related modifier protein 1* (SUMO-1) abhängig. Ausgehend von diesen Beobachtungen sollte überprüft werden, ob die Lokalisation von E1B in virusinfizierten Zellen ebenfalls durch diese Bereiche reguliert wird und ob dies Auswirkungen auf die verschiedenen Funktionen des E1B-Proteins im lytischen Infektionszyklus hat. Dazu wurden Mutanten im NES-Motiv (*pm4101*; L83A, L87A und L91A) und an der SUMO-Konjugationsstelle (*pm4102*; V103D und *pm4104*; K104R) hergestellt (Abb. 16). Auch das gleichzeitige Ausschalten von SKM und NES (*pm4103*) sollte mit einer entsprechenden Virusmutante untersucht werden.

Um die Serie der an der Pendelfunktion beteiligten Elemente abzuschließen, wurde eine Ad5-Mutante hergestellt, die an der potenziellen Ubc9-Bindungsstelle im E1B-55kDa verändert worden war (*pm4105*). Wie die Ubiquitinylierung ist auch die SUMOylierung ein dreistufiger Prozess mit einem E1-aktivierenden Enzym (Aos1/Uba2 Heterodimer), mit einem E2-konjugierenden Enzym (Ubc9) und mit einer substratspezifischen E3-Ligase (zur Übersicht: Pichler und Melchior, 2002). Anders als bei der Ubiquitinylierung aber ist bei der SUMOylierungsreaktion eine E3-Ligase in vielen Fällen nicht zwangsläufig notwendig und eine direkte Bindung von Ubc9 an sein Substrat zu beobachten (zur Übersicht: van Wilson und

Rangasamy, 2001). Wenn also die Annahme stimmt, dass Ubc9 mit der Bindungsstelle im E1B interagiert, dann müsste sich eine Ubc9-Mutante folglich wie eine Mutante an der SUMO-Konjugationsstelle verhalten. Zur Kontrolle wurde noch eine Ubc9/NES-Doppelmutante konstruiert (*pm4106*), die sich dann wie die SKM/NES-Doppelmutante verhalten müsste.

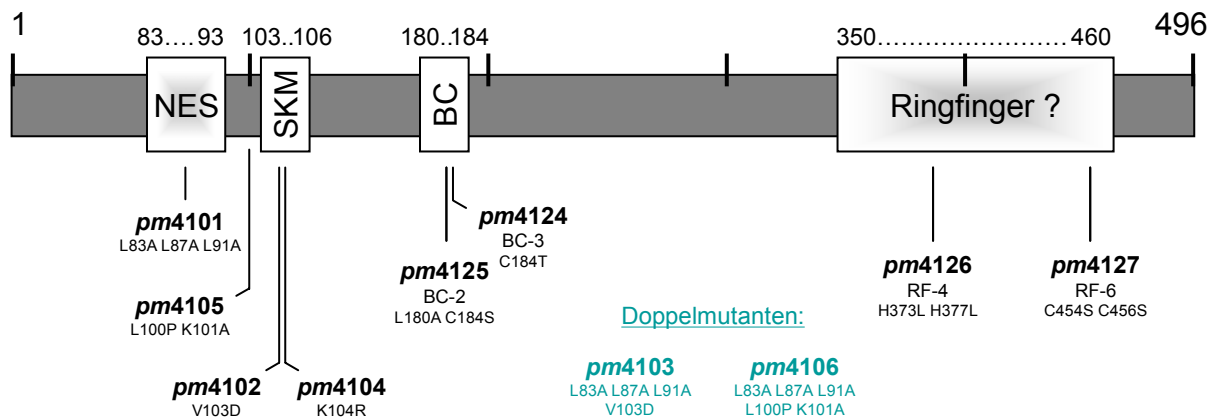


Abb. 16 Schematische Darstellung des E1B-55kDa-Proteins in verschiedenen Ad5-Virusmutanten.

Als grauer Kasten wurde das komplette E1B-Protein von Aminosäure 1 bis 496 dargestellt. In den hellen Kästen sind weitere wichtige Regionen im E1B mit der genauen Lage der entsprechenden AS angegeben. Die Beschriftung im unteren Teil der Darstellung gibt die Kurzbezeichnung der veränderten E1B-Virusmutanten mit Lage und Art der Mutation an. NES, nukleäres Exportsignal; SKM, SUMO-Konjugationsmotiv; BC, BC-Box; Ringfinger?, putative Ringfinger-Region.

5.2.3 Immunologische Charakterisierung der hergestellten Virusmutanten

Als erstes wurden die Gleichgewichtsmengen verschiedener viraler Proteine im Verlauf der Infektion untersucht. Dazu wurden die Zelllinien A549 und HeLa wie unter 4.3.4 beschrieben mit 5 bzw. 10 ffu (*fluorescent forming units*) pro Zelle infiziert, zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet (4.2.6), mit RIPA-Puffer aufgeschlossen (4.5.1) und mit Hilfe der *Western Blot*-Methode (4.5.6) analysiert. Da die Ergebnisse beider Zelllinien nahezu identisch waren, wurden nur die Resultate für HeLa-Zellen dargestellt (Abb. 17).

Ab dem Zeitpunkt 16 h nach Infektion konnte E1B-55kDa deutlich in den infizierten Zellen der meisten Virusmutanten (ausgenommen der E1B-Deletionsmutante *dl1520* und *pm4124*) nachgewiesen werden (Abb. 17). Mit Ausnahme von *pm4125*, bei der kein E1B detektiert werden konnte, zeigte der Grad der Expression des E1-Proteins

der restlichen Viruspunktmutanten keine signifikanten Unterschiede zum wt-Virus *dl309*. Im viralen Kontext hatte also keine der Punktmutationen im Pendelmotiv oder im putativen Ringfinger-Motiv einen Einfluss auf die Synthese bzw. auf die Stabilität des E1B-Proteins. Analog zu den Untersuchungen in den stabil-transformierten Zelllinien, wo BC-2 geringere Gleichgewichtsmengen aufwies, war auch die entsprechende Virusmutante durch eine verminderte E1B-Menge gekennzeichnet. *pm4125*, die Virusmutante analog zu BC-3, war hingegen nicht beeinflusst.

Bei der Untersuchung des Einzelstrang-DNA-bindenden Proteins (DBP) E2A-72kDa, einem weiteren frühen Protein von Ad5, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem wt und den Virusmutanten festgestellt werden (Abb. 17). Die drei charakteristischen Banden konnten zwischen 8 und 16 h nach Infektion mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers detektiert werden. Auch die Menge an DBP war bei allen verschiedenen Viren zu den entsprechenden Zeitpunkten annähernd gleich.

Unterschiedlich verhielten sich die Ad5-Varianten bei der Herstellung der späten Strukturproteine (Abb. 17). Mit Hilfe eines polyklonalen Kaninchenserums, der verschiedene Kapsidproteine von Ad5 erkennt, konnte ein deutlicher Unterschied der Deletionsmutante *dl1520* und der BC-Box-Mutante *pm4125* zu sämtlichen anderen Viren herausgearbeitet werden. Erst 48 h.p.i. sind bei den E1B-defizienten Virusmutanten die drei prominenten Strukturproteine Hexon (120 kDa), Penton (85 kDa) und Fiber (62 kDa) zu erkennen; bei allen anderen hingegen bereits etwa 24 h nach Infektion. Die Expression der späten Strukturproteine ist in HeLa-Zellen also stark vom Vorhandensein des E1B-Proteins abhängig.

Anders als bei HeLa-Zellen ist in A549-Zellen die Produktion später viraler Strukturproteine kaum vom E1B-55kDa-Protein abhängig (Daten nicht gezeigt). In dieser Zelllinie produzierten alle Virusmutanten - auch die Deletionsmutante - bereits 16 h.p.i. nahezu gleiche Mengen später Strukturproteine. Dies korreliert mit früheren Untersuchungen in denen gezeigt wurde, dass die virale Replikation in manchen Zelllinien stark und in anderen kaum von E1B-55kDa abhängig ist (Imler *et al.*, 1996; Goodrum und Ornelles, 1997, 1998; Rothmann *et al.*, 1998; Harada und Berk, 1999; Turnell *et al.*, 1999).

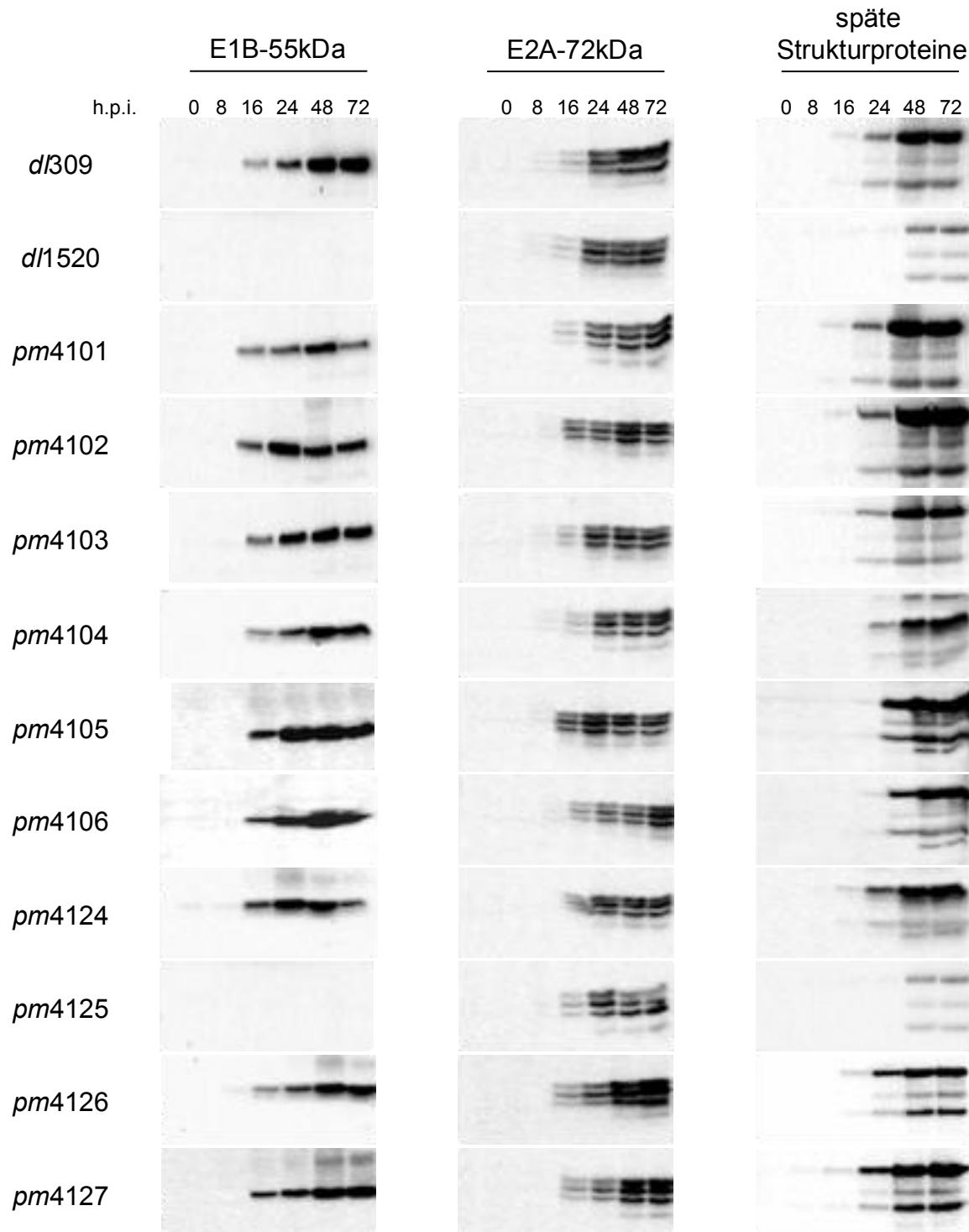


Abb. 17 Synthese viraler Proteine im Verlauf der Infektion.

3×10^6 HeLa-Zellen wurden in 100 mm-Zellkulturschalen ausgesät und am nächsten Tag mit 10 ffu/Zelle infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten (h.p.i.) geerntet. Der Zeitpunkt 0 bedeutet nicht infiziert (mock). In der linken Spalte sind die Namen der Virusmutanten angegeben (vgl. Abb. 16), wobei als wt *dl309* und E1B-Deletionsmutante *dl1520* verwendet wurden. In den nächsten drei Spalten sind die *Western Blot*-Analysen zur Untersuchung der Expression verschiedener viraler Proteine dargestellt. Für E1B-55kDa wurden 25 µg Gesamtzellextrakt auf 12 % SDS-Gelen aufgetrennt und mit dem monoklonalen Antikörper 2A6 (1:10 verdünnt) detektiert. Beim Nachweis von E2A-72kDa und den späten Strukturproteinen wurden jeweils 20 µg Gesamtprotein über ein 8 % Gel separiert. E2A wurde mit dem monoklonalen Antikörper B6-8 (1:10 verdünnt) und die späten Strukturproteine wurden mit dem polyklonalen Antiserum α -late (1:2000 verdünnt) detektiert.

5.2.4 Destabilisierung von p53 in virusinfizierten Zellen

Untersuchungen in virusinfizierten Zellen hatten gezeigt, dass die Expression von E1B-55kDa und E4orf6 zu einer dramatischen Reduktion der Halbwertszeit von p53 führt und somit der E1A-vermittelten Stabilisierung von p53 entgegenwirkt. In Ad5 wt-Virus infizierten Zellen, in denen sowohl das E1B-55kDa- als auch das E4orf6-Protein exprimiert werden, nimmt die Menge an p53 deutlich ab, wohingegen in Abwesenheit eines dieser beiden viralen Proteine der Tumorsuppressor akkumuliert (Grand *et al.*, 1994; Querido *et al.*, 1997; Ridgway *et al.*, 1997; Steegenga *et al.*, 1998). Der Abbau von p53 ist von der Wechselwirkung von E1B mit p53 und E4orf6 abhängig (Roth *et al.*, 1998; Cathomen und Weitzman, 2000; Querido *et al.*, 2001a; Shen *et al.*, 2001).

Um die Virusmutanten in Bezug auf ihre Fähigkeit p53 während des Infektionszykluses zu destabilisieren zu untersuchen, wurde der Nachweis der Degradation des Tumorsuppressorproteins in A549-Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit 5 ffu/Zelle infiziert (4.3.4), geerntet und in NP-40 aufgeschlossen (4.2.6 und 4.5.1) und im *Western Blot* (4.5.6) analysiert (Abb. 18).

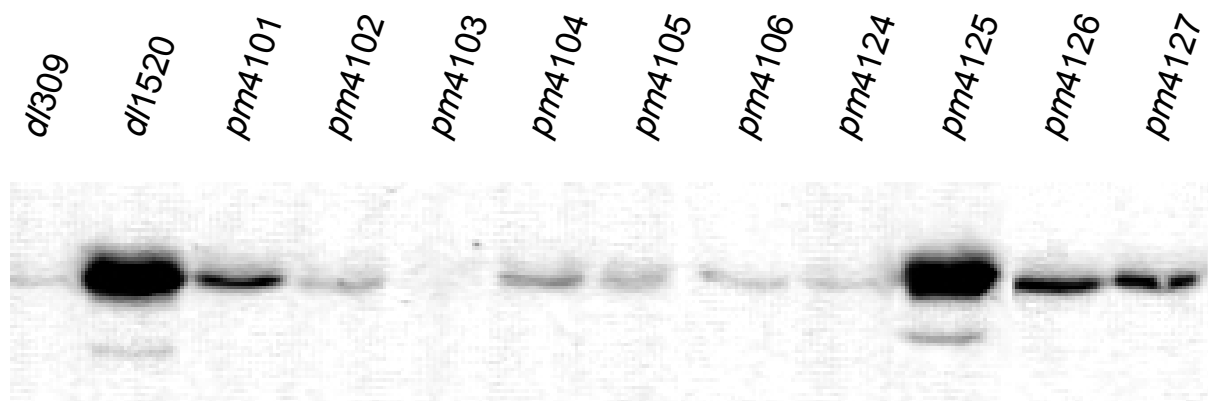


Abb. 18 Gleichgewichtsmengen von p53 in virusinfizierten Zellen.

2,5 × 10⁶ A549-Zellen wurden in 100 mm-Zellkulturschalen ausgesät, am nächsten Tag mit 5 ffu/Zelle der verschiedenen Virusmutanten infiziert, 24 h.p.i. geerntet und lysiert. Anschließend wurden je 50 µg Gesamtzellextrakt über 12 %ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt und mit dem monoklonalen p53-spezifischen Antikörper DO-1 (1:1000 verdünnt) detektiert.

Erwartungsgemäß akkumulierte p53 in A549-Zellen, die mit der E1B-Deletionsmutante *dl1520* infiziert worden waren. In den mit dem wt *dl309* infizierten Zellen hingegen wurde das p53-Protein nahezu vollständig abgebaut. Die p53-Gleichgewichtsmengen bei den Mutanten im Pendelmotiv waren ebenfalls meist stark reduziert. Einzig die E1B-NES-Mutante *pm4101* zeigte in diesem Versuch eine leicht erhöhte Menge des Tumorsuppressors nach 24 h.p.i. Auch die BC-Box-Mutante *pm4124* verhielt sich wie der wt und nur geringe Mengen an p53 waren detektierbar. Interessanterweise war die zweite BC-Box-Mutante *pm4125* nicht in der Lage den p53-Status zu reduzieren und verhielt sich im Test wie die Deletionsmutante *dl1520*. Die Punktmutanten *pm4126* und *pm4127* im putativen Ringfinger-Motiv waren, ebenso wie die NES-Mutante, leicht eingeschränkt in dieser Aktivität und konnten die p53-Mengen nicht komplett degradieren.

5.2.5 Untersuchung der viralen DNA-Synthese

Im Folgenden wurde überprüft, ob die verschiedenen Mutationen im E1B-55kDa-Gen einen Einfluss auf die Initiation der viralen DNA-Replikation haben. Das Einsetzen sowie der Verlauf der DNA-Replikation wurde durch ein modifiziertes PCR-Verfahren aus virusinfizierten Zellen bestimmt. Dazu wurden die Zelllinien A549 und HeLa mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (4.3.4), nach unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und aufgeschlossen (4.2.6 und 4.5.1). Die PCR-Reaktion wurde wie unter 4.3.5 beschrieben durchgeführt. Die Reaktionsprodukte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert und densitometrisch quantifiziert. Da sich die verschiedenen Viren in beiden Zelllinien sehr ähnlich verhielten, sind nur die Ergebnisse mit den HeLa-Zellen dargestellt (Abb. 19).

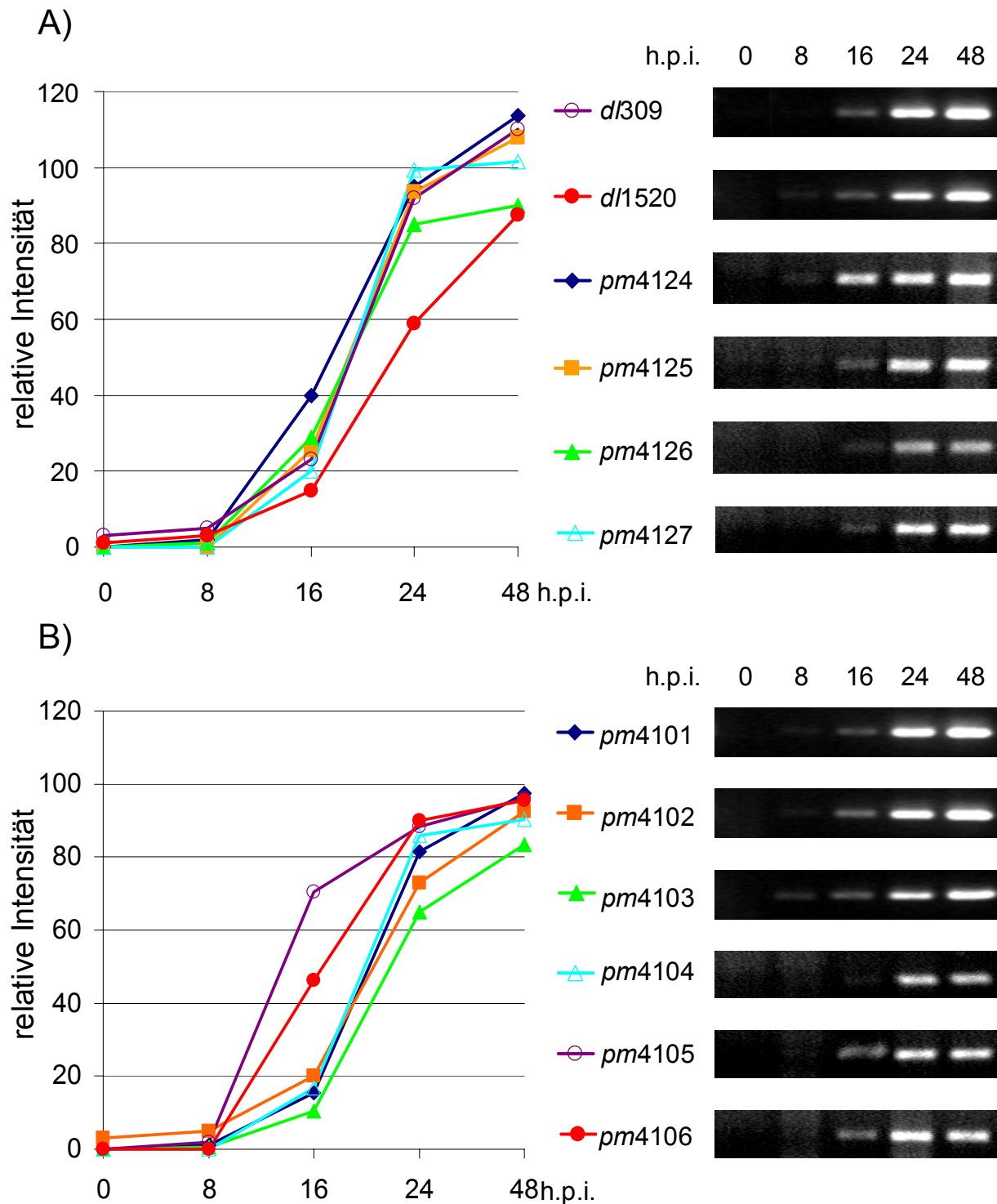


Abb. 19 Analyse der viralen DNA-Synthese.

3×10^6 HeLa-Zellen wurden in 100 mm-Zellkulturschalen ausgesät und am nächsten Tag mit 10 ffu/Zelle infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten (h.p.i.) geerntet. Die virale DNA-Synthese wurde durch PCR gemäß 4.3.5 bestimmt. Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel analysiert (rechte Seite) und die Intensität der Banden in Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegelen mit dem Computerprogramm Quantity One des ChemiDoc-Systems (BioRad) bestimmt. Hintergrundbereinigt wurden diese Intensitäten auf der linken Seite graphisch dargestellt (linke Seite). Der besseren Übersichtlichkeit halber wurden die erhaltenen Graphen in zwei separaten Diagrammen (A und B) dargestellt.

Die PCR-Analysen ergaben, dass sich der Zeitpunkt der Initiation der viralen DNA-Synthese bei den verschiedenen Virusmutanten kaum unterschied. In HeLa-Zellen war bereits 8 h.p.i. für die meisten Ad5-infizierten Zellen ein sehr schwaches Signal für E1B-55kDa knapp über der Detektionsgrenze zu erkennen, das nach 16 h nach Infektion bei allen untersuchten Adenoviren deutlich detektierbar war (Abb. 19). Bei den Versuchen mit A549-Zellen hingegen war die virale DNA bei allen Viren schon 8 h nach Infektion deutlich zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

Eine Aussage über die exakte Menge an gebildeter viraler DNA in den Zelllinien konnte mit diesem semi-quantitativen PCR-Ansatz nicht getroffen werden. Da jedoch bei allen Viren innerhalb einer Zelllinie die relative Intensität der DNA-Banden bei den entsprechenden Zeitpunkten annähernd gleich war, kann angenommen werden, dass die Mutationen keinen Einfluss auf die Effizienz der viralen DNA-Replikation haben. Dieses Ergebnis ist konsistent mit früheren Untersuchungen, in denen ebenfalls kein Unterschied bei der viralen DNA-Replikation zwischen wt und E1B-deletierten Viren festgestellt werden konnte (Pilder *et al.*, 1986; Williams *et al.*, 1986; Leppard und Shenk, 1989; Goodrum und Ornelles, 1997, 1998).

Es kann also daraus geschlossen werden, dass in den getesteten Zelllinien die frühe Phase des produktiven Replikationszykluses auch ohne ein funktionelles E1B-55kDa-Protein erfolgreich eingeleitet und abgeschlossen werden kann und lässt eine Funktion des Proteins vor allem in der späten Phase des Infektionszykluses vermuten.

5.2.6 *Host shut-off* in virusinfizierten Zellen

Im Anschluss wurde der Einfluss der Mutationen auf die virusinduzierte Blockade der zellulären Proteinbiosynthese (*host shut-off*) untersucht. Dieser Block der zellulären Genexpression findet auf zwei Ebenen statt und wird zum einen durch den selektiven Transport viraler mRNAs vom Zellkern ins Zytoplasma (Babich *et al.*, 1983; Babiss und Ginsberg, 1984; Babiss *et al.*, 1985; Pilder *et al.*, 1986) und zum

anderen durch die bevorzugte Translation viraler Transkripte reguliert (Beltz und Flint, 1979). Das Abschalten der zellulären Proteinsynthese sowie die Translation der späten viralen Strukturproteine wurde durch den Einbau von [35 S]-Methionin in die viralen und zellulären Proteine (vgl. 4.5.2) im Verlauf der Virusinfektion untersucht (Abb. 20).

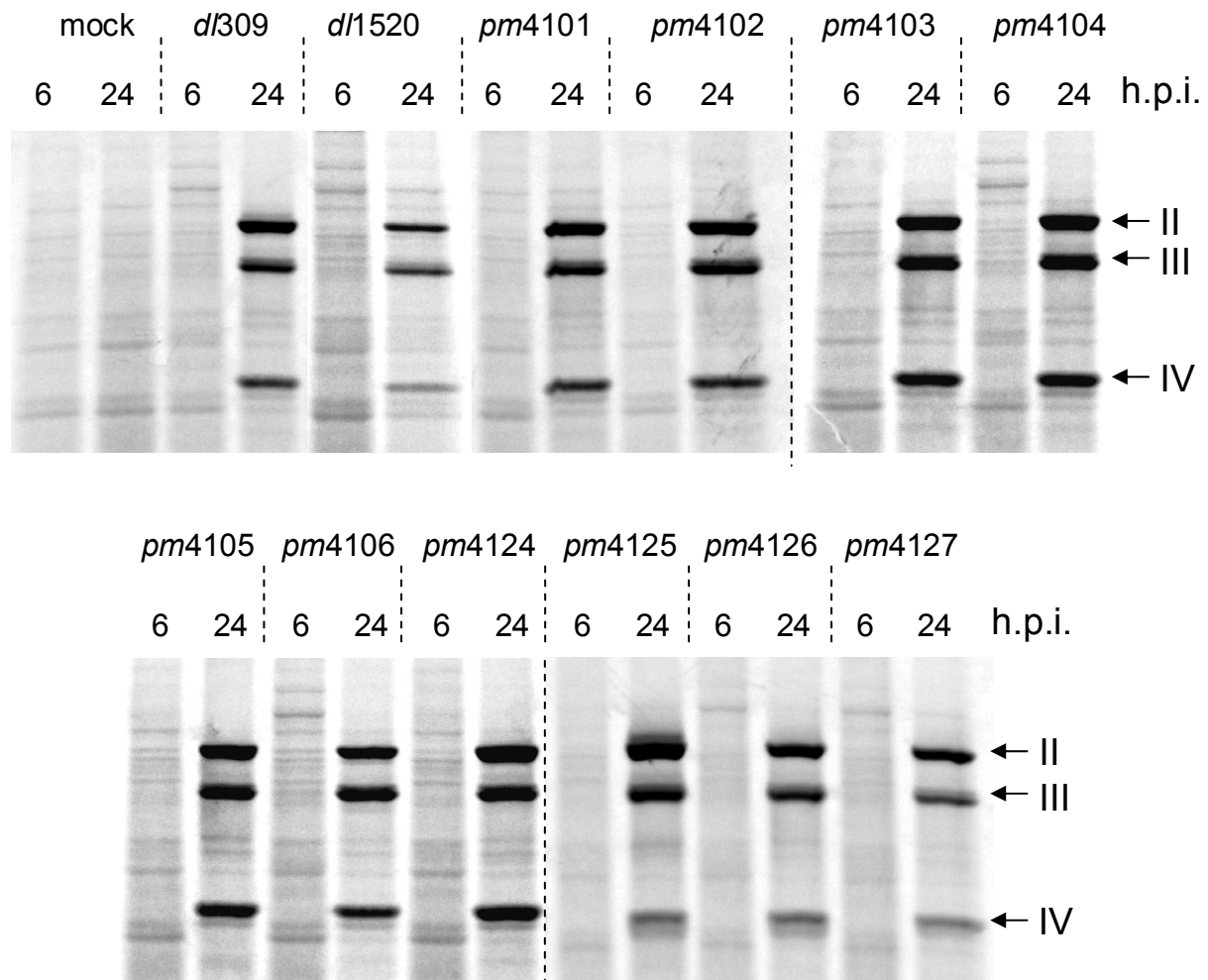


Abb. 20 Host shut-off in infizierten HeLa-Zellen.

3×10^6 HeLa-Zellen wurden in 100 mm-Zellkulturschalen ausgesät, am nächsten Tag mit 30 ffu/Zelle infiziert und zu den Zeitpunkten 6 und 24 h.p.i. radioaktiv markiert, geerntet und lysiert (4.5.2). Angereicherte Mengen an radioaktiv-markierten Proteinen wurden dann mittels SDS-PAGE (8 % Gele) aufgetrennt und über das *Phospho-Imager System Personal FX* (BioRad) ausgewertet. Die Lage der prominenten späten Strukturproteine Hexon (II), Penton (III) und Fiber (IV) ist durch Pfeile angedeutet. Über den Spuren sind die entsprechenden Adenoviren in Kurzschreibweise angegeben, wobei nicht-infizierte Zellen mit mock gekennzeichnet sind.

24 h nach Infektion konnte die Synthese der späten Strukturproteine in allen infizierten Zellen beobachtet werden. Auffällig war, dass einzig die E1B-Deletionsmutante *dl1520* in diesem Versuchsansatz deutlich geringere Mengen an

späten Strukturproteinen produzierte. Die De-novo-Synthese der betreffenden Proteine war in dieser Mutante offensichtlich gestört. Dieses Ergebnis war konsistent mit dem immunologischen Nachweis der späten Strukturproteine (vgl. 5.2.3) bei dem ebenfalls die Deletionsmutante drastisch reduzierte Gleichgewichtsmengen dieser Polypeptide in infizierten HeLa-Zellen zeigte. Interessanterweise konnten 6 h.p.i. in wt-infizierten Zellen einige hochmolekulare Banden detektiert werden, die keine Entsprechung in den mock-infizierten hatten. Da kein Ad5-Protein größer als die virale DNA-Polymerase (140 kDa) ist, musste es sich hierbei um zelluläre Proteine handeln, die infektionsbedingt stärker exprimiert wurden. 24 h.p.i. waren in den wt-infizierten Zellen diese Banden allerdings nicht mehr nachweisbar, was mit dem Abschalten der zellulären Proteinsynthese erklärbar wäre. Auch bei der Deletionsmutante *dl1520* waren diese Banden 6 h.p.i. deutlich nachweisbar; im Unterschied zum wt waren aber auch noch 24 h.p.i. diese Banden zu detektieren, was auf Defekte der E1B-Null-Mutante in Bezug auf den *host shut-off* schließen ließ. Dieses Verhalten war konsistent mit früheren Untersuchungen, bei denen *dl1520* ebenfalls bei der Abschaltung der zellulären Proteinsynthese defekt war (Querido *et al.*, 1997). Bei der Untersuchung der restlichen Mutanten waren einzig bei der E1B-NES-Mutante *pm4101* 24 h.p.i. schwach diese Banden zu erkennen. Dies deutet auf eine Beteiligung dieses Motivs beim *host shut-off* hin.

5.2.7 Produktion infektiöser Nachkommenviren

Die Produktion infektiöser Nachkommenviren ist je nach verwendeter Zelllinie unterschiedlich stark vom E1B-55kDa-Protein abhängig (Imler *et al.*, 1996; Goodrum und Ornelles, 1997, 1998; Rothmann *et al.*, 1998; Harada und Berk, 1999; Turnell *et al.*, 1999). Aus diesem Grund wurde die Ausbeute an Nachkommenviren in HeLa-Zellen bestimmt, da bei diesem die Virusreplikation stark vom Vorhandensein des E1B-55kDa-Proteins beeinflusst wird. Für die Untersuchungen wurden die Zellen mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert und wie unter 4.3.6 beschrieben, die Ausbeute an Nachkommenviren bestimmt (Abb. 21).

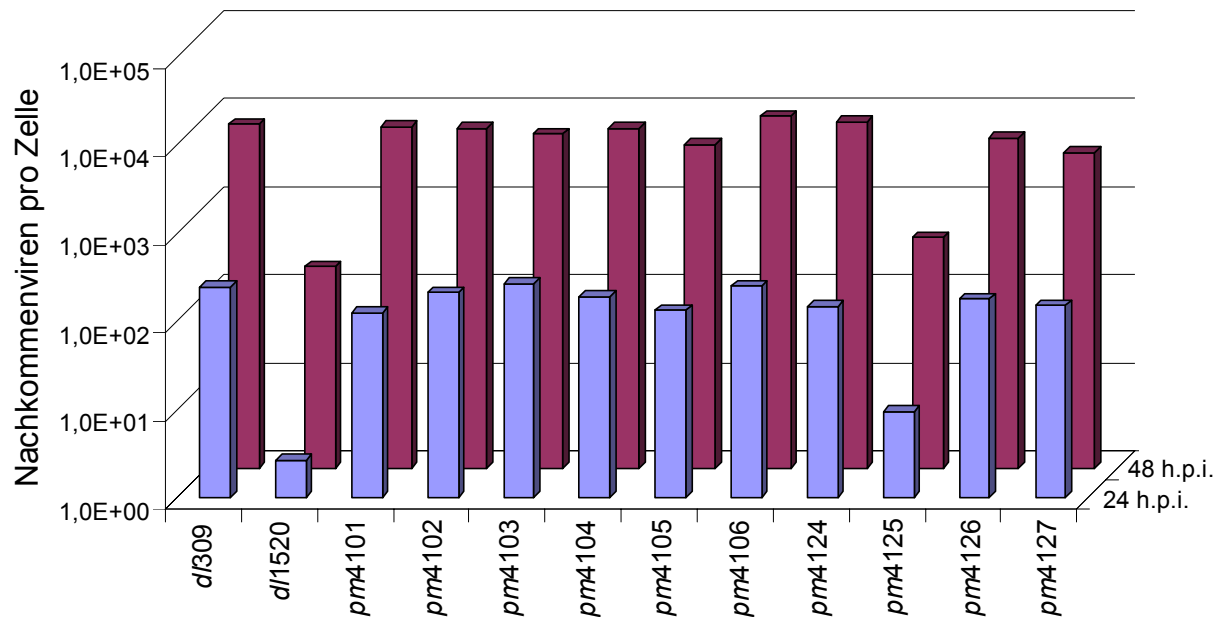


Abb. 21 Produktion infektiöser Nachkommenviren in HeLa-Zellen.

3×10^6 HeLa-Zellen wurden in 100 mm-Zellkulturschalen ausgesät, am nächsten Tag mit 10 ffu/Zelle infiziert und zu den Zeitpunkten 24 und 48 h.p.i. geerntet. Anschließend wurden aus den infizierten Zellen die Nachkommenviren isoliert und auf 911-Zellen die Anzahl der infektiösen Nachkommenviren pro Zelle bestimmt. Als wt-Virus wurde *dl309* benutzt.

Wie erwartet war die E1B-Deletionsmutante *dl1520* stark in der Produktion von Nachkommenviren eingeschränkt. Verglichen mit dem wt-Virus waren bei der Deletionsmutante 48 h.p.i. 50-mal weniger und 24 h.p.i. sogar 100-mal weniger Nachkommenviren nachweisbar. Auch die Virusmutante *pm4125*, in der kein E1B-55kDa-Protein nachgewiesen werden konnte, war auffällig in der Fähigkeit Nachkommenviren zu produzieren defekt. Alle anderen E1B-Virusmutanten hingegen zeigten keine deutlichen Defizite bei der Nachkommenvirenproduktion und lieferten sowohl 24 als auch 48 h.p.i. ähnliche Werte wie das wt-Virus.

5.2.8 Immunfluoreszenzanalysen zur Lokalisation und Interaktion der verschiedenen E1B-Mutanten

Im Folgenden wurden die verschiedenen Virusmutanten bezüglich ihrer Lokalisation von E1B in infizierten Zellen und ihrer Interaktion von E1B mit viralen und zellulären Proteinen untersucht. In wt-virusinfizierten Zellen zeigt das E1B-55kDa-Protein ein komplexes Muster sowohl nukleärer als auch zytoplasmatischer Lokalisation (Sarnow *et al.*, 1982b; Grand und Gallimore, 1984; Smiley *et al.*, 1990;

Ornelles und Shenk, 1991). Im Zytoplasma liegt es einerseits in einer diffusen Verteilung vor, andererseits lokalisiert es in einer oder auch mehreren als *perinuclear bodies* bezeichneten Strukturen am Rande des Nukleus. Im Zellkern ist das Polypeptid ebenfalls diffus verteilt (wobei die Bereiche der Nukleoli ausgeschlossen sind) und lokalisiert darüber hinaus spezifisch an nukleären Strukturen, die wahrscheinlich die viralen Transkriptions- und Replikationszentren darstellen (Ornelles und Shenk, 1991). Es wird angenommen, dass die differenzielle subzelluläre Verteilung des E1B-55kDa-Proteins durch spezifische Interaktionen mit zellulären und viralen Faktoren sowie durch Oligomerisation reguliert wird (Grand und Gallimore, 1984; Grand *et al.*, 1994). Von besonderem Interesse waren in diesem Zusammenhang die Mutanten im Pendelmotiv des E1B-Proteins (NES und SKM-Mutanten), da mit Transfektions- und Heterokaryon-Versuchen mit dem isolierten Protein nachgewiesen wurde, dass sich entsprechende Mutanten nicht mehr selbstständig zwischen Zellkern und Zytoplasma bewegen können (Krätzer *et al.*, 2000; Dosch *et al.*, 2001; Endter *et al.*, 2001; Endter, 2002).

5.2.8.1 Lokalisation von E1B-55kDa in infizierten A549-Zellen

Zunächst wurde die Lokalisation von E1B-55kDa mit Immunfluoreszenzanalysen (4.5.8) in infizierten A549-Zellen 20 h.p.i. bestimmt (Abb. 22).

In Zellen, die mit dem Ad5 Wildtypvirus *pg4100* infiziert wurden, zeigte das E1B-Protein wie erwartet ein komplexes Lokalisationsmuster. Das Protein war sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern (mit Aussparung der Nukleoli) diffus verteilt. Zudem lokalisierte E1B-55kDa in einer stärker angefärbten Struktur an der zytoplasmatischen Seite der Kernmembran, dem *perinuclear body* (Abb. 22, a1 und a2). Die mit dem Deletionsvirus *dl1520* infizierten Zellen waren erwartungsgemäß E1B-negativ (Abb. 22, b1 und b2). Virusmutanten mit einer einzigen Mutation im Pendelmotiv (*pm4101*, *pm4102*, *pm4104* und *pm4105*) unterschieden sich jedoch deutlich vom wt-Ad5. So war in der NES-Mutante *pm4101* (Abb. 22, c1 und c2) E1B fast ausschließlich im Kern zu detektieren und lokalisierte dort interessanterweise in kleinen runden subnukleären Strukturen. Dies zeigt, dass das E1B-NES tatsächlich

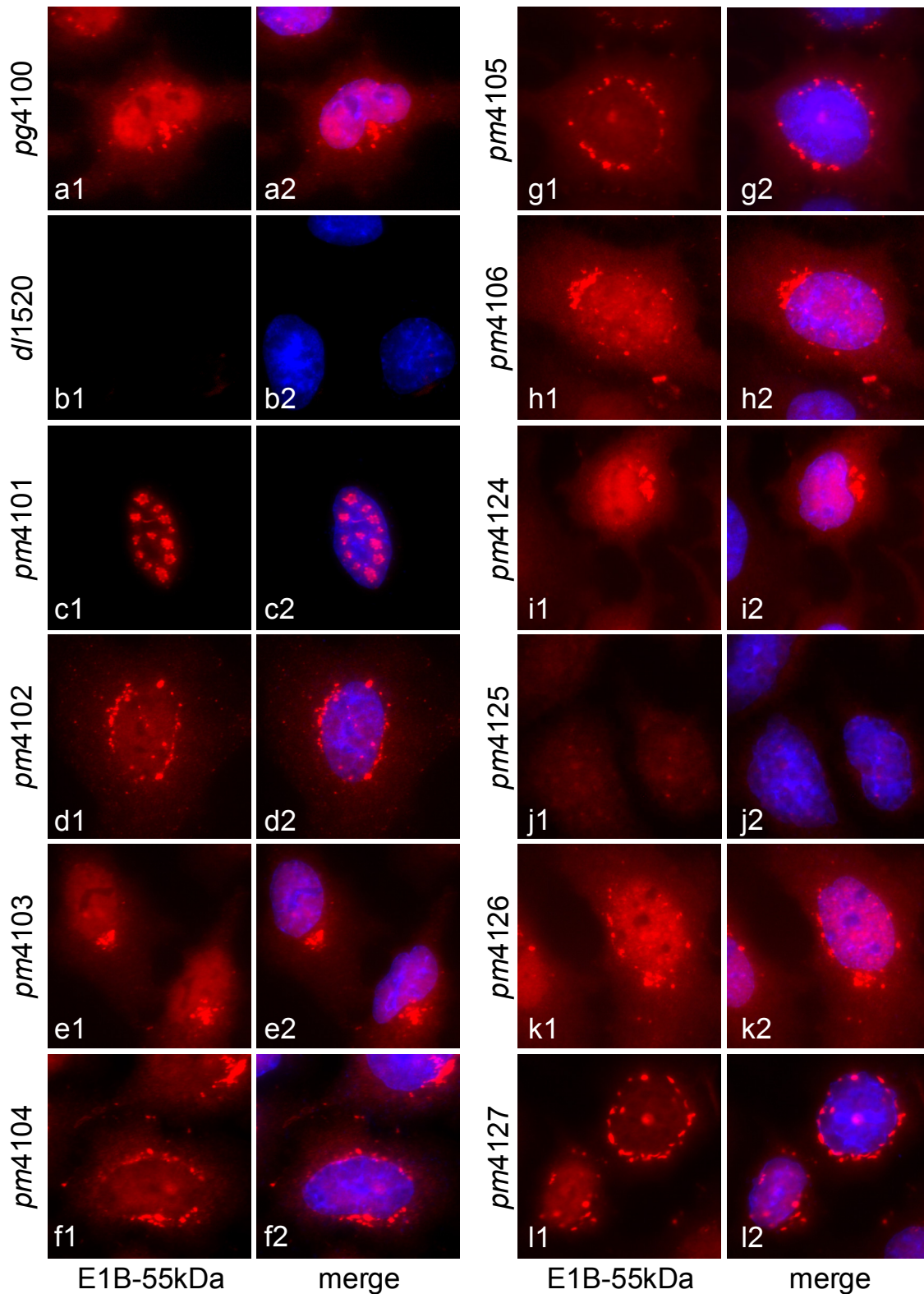


Abb. 22 Immunfluoreszenzanalysen zur subzellulären Lokalisation des E1B-55kDa-Proteins.

A549-Zellen wurden auf Deckgläser ausgesät und bei einer Konfluenz von 60 % mit den Virusmutanten infiziert. Die Zellen wurden 20 h.p.i. mit Paraformaldehyd fixiert (4.5.8.1), mit dem E1B-55kDa-spezifischen Antikörper 2A6 inkubiert und mit einem TR-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper nachgewiesen (4.5.8.3). Zusätzlich wurden die Zellkerne mit dem DNA-bindenden Farbstoff DAPI markiert, der eine blaue Fluoreszenz erzeugte. TR-markierte E1B-55kDa-Mutanten (a1 - l1); Überlagerung aus TR-gefärbtem E1B und DAPI-Kernfärbung (a2 - l2). Vergrößerung 1000x.

für den nukleären Export des Proteins verantwortlich ist. Mutationen an der SUMO-Konjugationsstelle (*pm4102* und *pm4104*) sowie am Ubc9-Bindungsmotiv (*pm4105*) hingegen führten zu einer präferenziellen Akkumulation des Proteins im Zytoplasma und dort speziell in einer Vielzahl kleiner kernmembranassoziierter Strukturen (Abb. 22, d1 und d2, f1 und f2, g1 und g2). Mutationen die also die SUMOylierung von E1B-55kDa beeinflussen resultieren in einem hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisierten Protein, was auf eine Funktion der SUMO-Modifikation beim nukleären Import bzw. bei der nukleären Retention des adenoviralen Proteins hindeutet. Interessanterweise zeigten die Doppelmutanten *pm4103* und *pm4106*, die sowohl im nukleären Exportsignal (NES) als auch in der SUMO-Modifikation defekt waren, einen intermediären Phänotyp und waren sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern verteilt (Abb. 22, e1 und e2, h1 und h2). Aber im Unterschied zum wt war bei den Doppelmutanten E1B-55kDa verstärkt in punktförmigen Strukturen sowohl im Kern als auch im Zytoplasma lokalisiert. Auch der *perinuclear body*, der in wt-infizierten Zellen eine kompakte Form hat, konnte in den Doppelmutanten als Ansammlung kleinerer rundlicher Strukturen angesprochen werden.

Bei den Zellen die mit der BC-Box-Mutante *pm4124* infiziert wurden (Abb. 22, i1 und i2) konnte kein Unterschied zu wt-infizierten Zellen festgestellt werden. Sowohl die Verteilung als auch die Menge des E1B-Proteins waren bei beiden Viren vergleichbar. In *pm4125*-infizierten Zellen hingegen war nur sehr schwaches Signal für E1B-55kDa nachweisbar (Abb. 22, j1 und j2). Eine Lokalisation des adenoviralen Proteins im *perinuclear body* konnte nicht detektiert werden.

In den Virusmutanten im putativen Ringfinger-Motiv (*pm4126* und *pm4127*) konnte E1B ebenfalls im Kern und im Zytoplasma detektiert werden (Abb. 22, k1 und k2, l1 und l2). Ähnlich wie bei den Untersuchungen der stabilen BRK-Zelllinien (vgl. 5.1.5) zeichneten sie sich jedoch dadurch aus, dass die Mutationen im E1B zu einer veränderten Morphologie des perinukleären Kompartiments führten. Anstatt seines charakteristischen rundlichen Aussehens im wt war es in den potenziellen Ringfinger-Mutanten in viele kleine Strukturen verteilt, die sich um den Kern

angeordnet hatten. Da gerade das mutmaßliche Ringfinger-Motiv in enger Verbindung zu Protein-Protein-Wechselwirkungen gesehen wird, waren weitere Untersuchungen zur Interaktion der veränderten Proteine mit zellulären oder viralen Faktoren von besonderem Interesse.

Aufgrund der Redundanz der Bilder von *pg4100* und *pm4124* (Abb. 22, a1 und i1), von *pm4102*, *pm4104* und *pm4105* (Abb. 22, d1, f1 und g1) sowie von *pm4103* und *pm4106* (Abb. 22, e1 und h1) wird im Folgenden jeweils nur eine Abbildung von *pg4100*, *pm4102* bzw. *pm4103* dargestellt. Auch auf *pm4125* wird wegen der geringen Expression von E1B in den folgenden Abbildungen verzichtet.

5.2.8.2 Kolokalisation von E1B-55kDa mit E4orf3 und E4orf6

E4orf3 und E4orf6, zwei frühe Proteine von Ad5, modulieren die Kontrollmechanismen der Wirtszelle im produktiven Infektionszyklus auf allen Ebenen der Genexpression. Beide Proteine zeigen zum Teil funktionelle Überlappung, wobei jedes der Genprodukte voneinander unabhängige Funktionen bezüglich der viralen DNA-Replikation, der späten Strukturproteinsynthese, dem Abschalten der Wirtszell-Proteinsynthese und der Produktion von Nachkommenviren hat (Halbert *et al.*, 1985; Bridge und Ketner, 1989; Huang und Hearing, 1989; Bridge und Ketner, 1990). Es wird angenommen, dass einige der redundanten lytischen Funktionen auf der Wechselwirkung der beiden E4-Proteine mit gleichen viralen und zellulären Faktoren beruhen. Sowohl E4orf3 als auch E4orf6 binden beispielsweise an E1B-55kDa (Sarnow *et al.*, 1984; Rubenwolf *et al.*, 1997; Leppard und Everett, 1999; Nevels *et al.*, 1999a), führen zur Akkumulation von E1B im Kern und dirigieren es zu verschiedenen virus-induzierten Strukturen im Zellkern (Ornelles und Shenk, 1991; Goodrum *et al.*, 1996; König *et al.*, 1999; Leppard und Everett, 1999). Diese Wechselwirkungen zwischen E4orf3 und den verschiedenen E1B-Protein-Mutanten (Abb. 23) bzw. E4orf6 und den verschiedenen E1Bs (Abb. 24) wurde durch Immunfluoreszenzuntersuchungen in Ad5-infizierten A549-Zellen 20 h.p.i. überprüft.

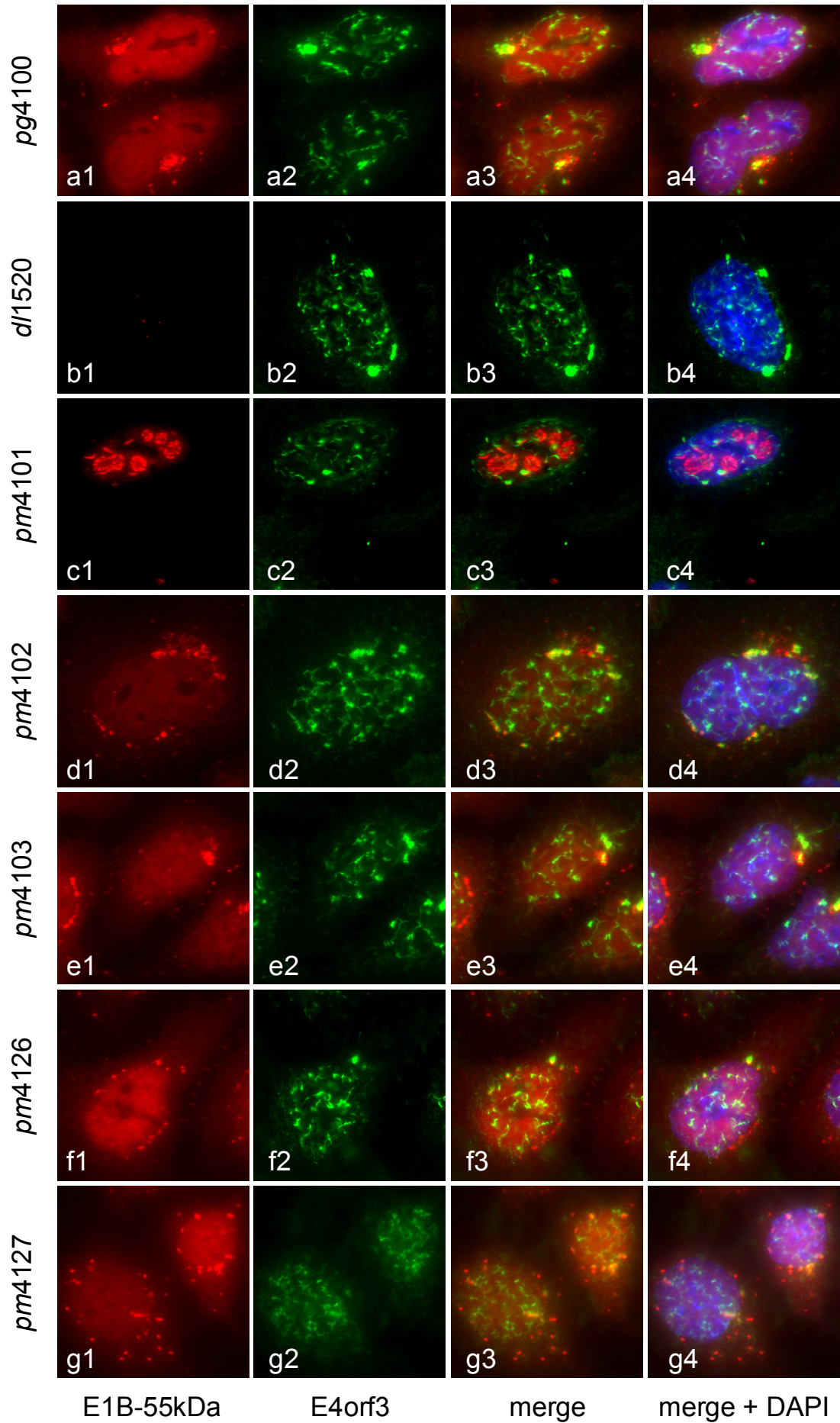


Abb. 23 Immunfluoreszenzanalysen zur Kolokalisation von E1B-55kDa mit E4orf3.

A549-Zellen wurden auf Deckgläser ausgesät und bei einer Konfluenz von 60 % mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert. Die Zellen wurden 20 h.p.i. mit Paraformaldehyd fixiert (4.5.8.1), mit den spezifischen Antikörpern gegen E1B-55kDa (2A6; Maus) und E4orf3 (6A11; Ratte) inkubiert und mit einem TR-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper bzw. einem FITC-gekoppelten Anti-Ratte-Antikörper nachgewiesen (4.5.8.3). Zusätzlich wurden die Zellkerne mit dem DNA-bindenden Farbstoff DAPI markiert, der eine blaue Fluoreszenz erzeugte. TR-markierte E1B-55kDa-Mutanten (a1 – g1); FITC-markiertes E4orf3 (a2 – g2); Überlagerung aus TR-gefärbtem E1B und FITC-markiertem E4orf3 (a3 – g3); Überlagerung aus TR-gefärbtem E1B, FITC-markiertem E4orf3 und DAPI-Kernfärbung (a4 – g4). Vergrößerung 1000x.

In Zellen, die mit dem Ad5 wt *pg4100* infiziert worden waren (Abb. 23, a1 – a4), zeigte E4orf3 wie beschrieben eine Verteilung in elongierten, fibrillären Strukturen, den sog. *nuclear tracks*. Zusätzlich war das E4-Protein im Kernmembran-assoziierten *perinuclear body* nachzuweisen. Exklusiv in diesem Kompartiment fand eine Kolokalisation von E1B mit E4orf3 statt und konnte in den Überlagerungen (Abb. 23, a3 und a4) als gelbgefärbte Bereiche dargestellt werden. Auch die Infektionen mit den Virusmutanten resultierten in einer vergleichbaren Verteilung von E4orf3. Selbst bei der Deletionsmutante (Abb. 23, b1 – b4) konnte E4orf3 in den *nuclear tracks* und im *perinuclear body* detektiert werden, was auf eine E1B-unabhängige Verteilung in diese Strukturen schließen lässt. Ein gleichzeitiges Auftreten von E1B und E4orf3 war also nur zu beobachten, wenn E1B ebenfalls im perinukleären Kompartiment vorlag. Interessanterweise war in der E1B-NES-Mutante *pm4101* (Abb. 23, c1 – c4) die Menge des E4-Proteins reduziert, was ein Effekt der primären Lokalisation von E1B-55kDa im Kern sein könnte. Akkumulierten die mutierten E1-Proteine hingegen im Zytoplasma (Abb. 23, d1 – d4) oder zeichnete sich durch eine Veränderung des *perinuclear bodies* aus (Abb. 23, f1 – f4 und g1 – g4), war die Expression von E4orf3 unbeeinflusst.

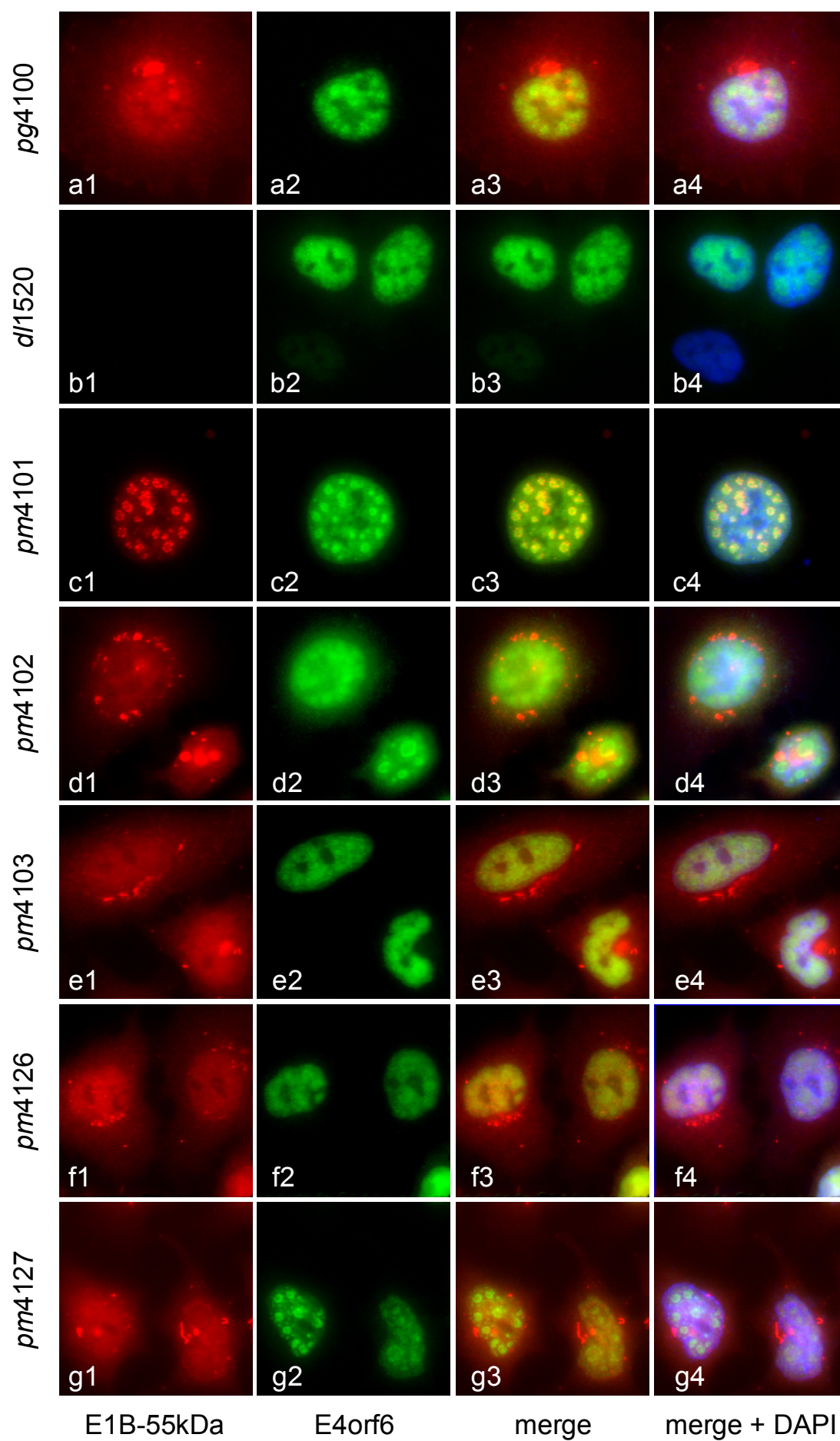


Abb. 24 Immunfluoreszenzanalysen zur Kolokalisation von E1B-55kDa mit E4orf6.

A549-Zellen wurden auf Deckgläser ausgesät und bei einer Konfluenz von 60 % mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert. Die Zellen wurden 20 h.p.i. mit Paraformaldehyd fixiert (4.5.8.1), mit den spezifischen Antikörpern gegen E1B-55kDa (7C11; Ratte) und E4orf6 (RSA#3; Maus) inkubiert und mit einem TR-gekoppelten Anti-Ratte-Antikörper bzw. einem FITC-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper nachgewiesen (4.5.8.3). Zusätzlich wurden die Zellkerne mit dem DNA-bindenden Farbstoff DAPI markiert, der eine blaue Fluoreszenz erzeugte. TR-markierte E1B-55kDa-Mutanten (a1 - g1); FITC-markiertes E4orf6 (a2 - g2); Überlagerung aus TR-gefärbtem E1B und FITC-markiertem E4orf6 (a3 - g3); Überlagerung aus TR-gefärbtem E1B, FITC-markiertem E4orf6 und DAPI-Kernfärbung (a4 - g4). Vergrößerung 1000x.

Dann wurde die Kolokalisation von E1B und E4orf6 untersucht. In den *pg4100* (wt)-infizierten Zellen (Abb. 24, a1 - a4) lag E4orf6 als diffus verteiltes, nukleäres aber nicht nukleoläres Protein vor, das teilweise in kleineren, subnukleären Strukturen organisiert war. Wie bei E4orf3 war auch hier in den Virusmutanten-infizierten A549-Zellen die Expression von E4orf6 gänzlich vom E1B-Status unabhängig. Auch bezüglich der Lokalisation des adenoviralen Proteins konnten keine Unterschiede zwischen wt und den verschiedenen E1B-Virusmutante festgestellt werden. E4orf6 und die meisten E1B-Varianten sind zumindest zum Teil diffus im Kern verteilt. Ob es sich hierbei aber um eine echte Kolokalisation der beiden Proteine handelte oder ob beide Polypeptide nur zufällig im selben Kompartiment vorkamen konnte mit Hilfe der Immunfluoreszenzanalyse nicht herausgearbeitet werden. Anders verhielt es sich jedoch bei der E1B-NES-Mutante *pm4101*. E1B lokalisierte, wie bereits besprochen, in kleinen sphärischen Strukturen im Zellkern (Abb. 24, b1). Interessanterweise kolokalisierten diese Bereiche mit den rundlichen subnukleären Strukturen die vom E4orf6-Antikörper erkannt wurden (Abb. 24, b2 - b4). Eine stärkere Vergrößerung der Überlagerungen von E1B und E4orf6 zeigt jedoch, dass die beiden Proteine nicht exakt kolokalisierten. Es war vielmehr so, dass der Antikörper gegen das E4orf6 eine subnukleäre Struktur angefärbt hat, an deren Peripherie E1B-NES lokalisierte.

5.2.8.3 Kolokalisation von E1B-55kDa mit E2A-72kDa

Untersuchungen von Ornelles und Shenk (1991) haben gezeigt, dass E4orf6 für eine Lokalisation von E1B an viralen nukleären Einschlusskörpern verantwortlich ist, von denen angenommen wird, dass sie die Orte der viralen DNA-Transkription und Replikation darstellen. Es wurde deshalb untersucht ob die verschiedenen E1B-Proteine mit den viralen Transkriptions- und Replikationszentren kolokalisierten. Als Markerprotein für die viralen Transkriptions- und Replikationszentren wurde das Einzelstrang-DNA-bindendes Protein (DBP) E2A-72kDa verwendet (Abb. 25).

E2A-72kDa war in wt-infizierten (Abb. 25, a1 – a4) Zellen diffus im Zellkern verteilt, wobei der größte Teil in kleinen, subnukleären Strukturen organisiert war, die wahrscheinlich die Orte der viralen DNA-Transkription und Replikation darstellten. In allen untersuchten Virusmutanten-infizierten A549-Zellen waren keine Unterschiede in der Lokalisation und in der Expression von DBP feststellbar, was auf einen vergleichbaren Ablauf der Infektion in den verschiedenen Viren schließen ließ. Die bei den Immunfluoreszenz-Untersuchungen mit E4orf6 aufgestellte Vermutung das E1B-NES eventuell mit den viralen Replikationszentren kolokalisierte konnte durch diese Untersuchungen bestätigt werden. Analog zu den Bildern mit E4orf6 findet man auch hier bei stärkerer Vergrößerung das E1B-NES an der Peripherie der DBP-markierten Strukturen lokalisiert. Eine Zerstörung des nukleären Exportsignals von E1B führt also zu einer Akkumulation von E1B an den viralen Transkriptions- und Replikationszentren.

Gerade in Bezug auf die Modellvorstellung das E1B den Transport der späten viralen mRNA unterstützt ist dieses Ergebnis von besonderer Bedeutung.

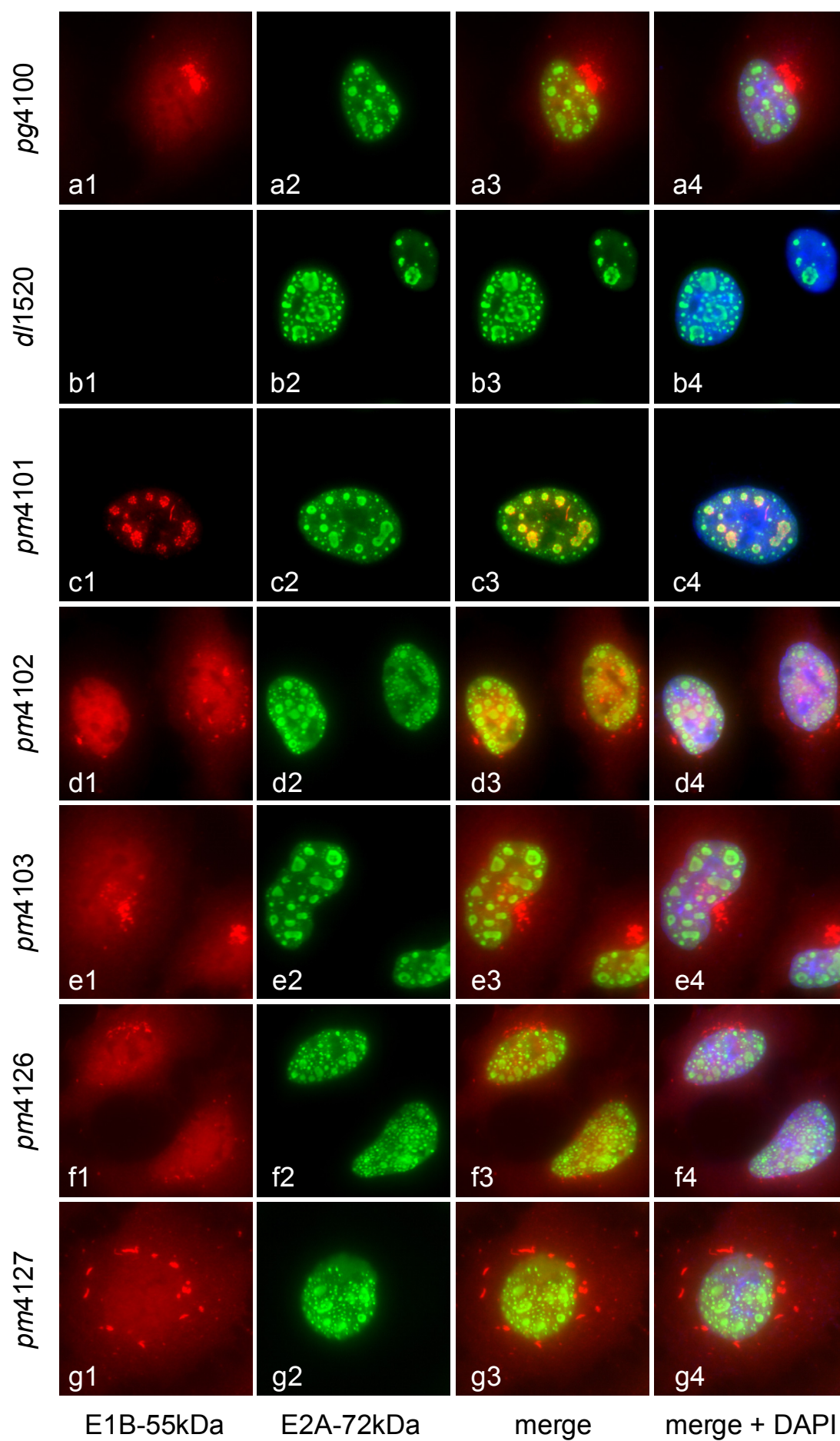


Abb. 25 Immunfluoreszenzanalysen zur Kollokalisierung von E1B-55kDa mit E2A-72kDa.

A549-Zellen wurden auf Deckgläser ausgesät und bei einer Konfluenz von 60 % mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert. Die Zellen wurden 20 h.p.i. mit Paraformaldehyd fixiert (4.5.8.1), mit den spezifischen Antikörpern gegen E1B-55kDa (7C11; Ratte) und E2A-72kDa (B6-8; Maus) inkubiert und mit einem TR-gekoppelten Anti-Ratte-Antikörper bzw. einem FITC-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper nachgewiesen (4.5.8.3). Zusätzlich wurden die Zellkerne mit dem DNA-bindenden Farbstoff DAPI markiert, der eine blaue Fluoreszenz erzeugte. TR-markierte E1B-55kDa-Mutanten (a1 – g1); FITC-markiertes E2A-72kDa (a2 – g2); Überlagerung aus TR-gefärbtem E1B-55kDa und FITC-markiertem E2A-72kDa (a3 – g3); Überlagerung aus TR-gefärbtem E1B, FITC-markiertem E2A-72kDa und DAPI-Kernfärbung (a4 – g4). Vergrößerung 1000x.

5.2.8.4 Immunhistochemischer Nachweis der Lokalisation und Degradation von p53 in infizierten Zellen

Analog zu den Untersuchungen der Gleichgewichtsmengen von p53 in virusinfizierten Zellen (vgl. 5.2.4) sollte mit Hilfe der Immunfluoreszenzanalyse die Lokalisation und Degradation des Tumorsuppressors überprüft werden. Dazu wurden die Zellen mit 20 ffu/Zelle infiziert (4.3.4), mit Paraformaldehyd fixiert (4.5.8.1) und anschließend immunhistochemisch (4.5.8.3) nachgewiesen (Abb. 26).

Western Blot-Analysen der virusinfizierten Zellen hatten bereits gezeigt, dass die Expression von wt-E1B-55kDa und E4orf6 zu einer dramatischen Reduktion der Halbwertszeit von p53 führt, wohingegen in Abwesenheit eines dieser beiden viralen Proteine der Tumorsuppressor akkumuliert (Grand *et al.*, 1994; Querido *et al.*, 1997; Ridgway *et al.*, 1997; Steegenga *et al.*, 1998). Diese Abhängigkeit konnte auch mit den virusinfizierten A549-Zellen nachvollzogen werden (Abb. 26). Während in den Zellen, die mit dem E1B-Deletionsvirus dl1520 infiziert worden waren, eine deutliche Akkumulation des Tumorsuppressors festzustellen war, konnten in den wt-infizierten Zellen (pg4100) p53 nur sehr schwach detektiert werden. Zusätzlich zeigte p53 in den wt-infizierten Zellen eine veränderte Lokalisation. Anders als bei der Deletionsmutante, bei der p53 diffus im Kern (mit Ausnahme der Nukleoli) verteilt war, zeigten die Aufnahmen von p53 in wt-infizierten Zellen eine eher punktförmige Verteilung des Suppressorproteins im Nukleus. Zudem konnte eine auffällige Anhäufung in der Nähe des perinukleären Kompartiments beobachtet werden. Auch bei den Virusmutanten war die p53-Verteilung vergleichbar zum wt-Virus. Analog

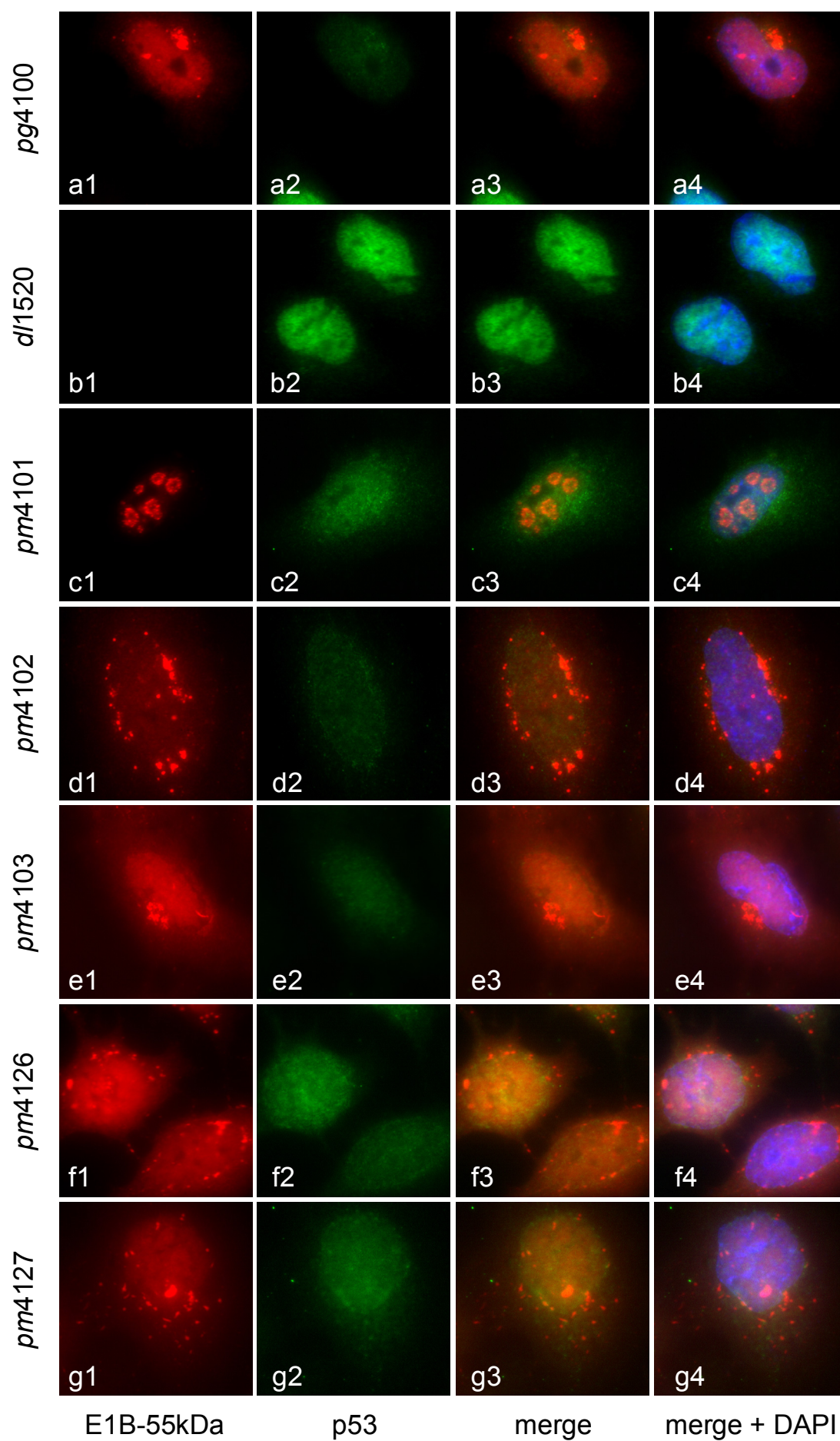


Abb. 26 Immunfluoreszenzanalysen zur Kolokalisation von E1B-55kDa mit p53.

A549-Zellen wurden auf Deckgläser ausgesät und bei einer Konfluenz von 60 % mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert. Die Zellen wurden 20 h.p.i. mit Paraformaldehyd fixiert (4.5.8.1), mit den spezifischen Antikörpern gegen E1B-55kDa (2A6; Maus) und p53 (Fl393; Kaninchen) inkubiert und mit einem TR-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper bzw. einem FITC-gekoppelten Anti-Kaninchen-Antikörper nachgewiesen (4.5.8.3). Zusätzlich wurden die Zellkerne mit dem DNA-bindenden Farbstoff DAPI markiert, der eine blaue Fluoreszenz erzeugte. TR-markierte E1B-55kDa-Mutanten (a1 – g1); FITC-markiertes p53 (a2 – g2); Überlagerung aus TR-gefärbtem E1B und FITC-markiertem p53 (a3 – g3); Überlagerung aus TR-gefärbtem E1B, FITC-markiertem p53 und DAPI-Kernfärbung (a4 – g4). Vergrößerung 1000x.

zu den *Western Blot*-Analysen (vgl. 5.2.4) der virusinfizierten Zellen waren auch mit Hilfe der Immunfluoreszenzanalysen erhöhte p53-Mengen in der NES-Mutante (*pm4101*; Abb. 26, c2) und den Ringfinger-Mutanten (*pm4126* und *pm4127*; Abb. 26, f2 und g1) nachzuweisen. Eine Abhängigkeit der p53-Mengen vom nukleären Exportsignal und von der putativen Ringfinger-Domäne konnte mit diesem Versuchsansatz bestätigt werden.

5.2.8.5 Immunhistochemischer Nachweis der Umverteilung und Degradation von Mre11 in infizierten Zellen

Zusätzlich zu der Interaktion mit p53 konnte kürzlich ein weiteres Polypeptid identifiziert werden, das mit E1B wechselwirkt. Es handelt sich hierbei um das Mre11-Protein (Stracker *et al.*, 2002), einem Bestandteil des Multienzymkomplexes Mre11-Rad50-NBS1. Normalerweise ist dieser Komplex an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, der meiotischen Rekombination und der Erhaltung der Telomere beteiligt (Carney *et al.*, 1998; Haber, 1998; Petrini, 1999; Zhu *et al.*, 2000).

Stracker und Mitarbeiter konnten jedoch zeigen, dass diesem Komplex auch eine Bedeutung während der adenoviralen Replikation zukommt. Nicht inhibiert führt die Aktivität dieses Multienzymkomplexes zur Konkaterisierung doppelsträngiger viraler DNA-Genome und somit zu einer Reduktion infektiöser Viruspartikel. Frühere Experimente zeigten bereits, dass E4-deletierte Adenoviren eine starke Konkaterisierung aufwiesen (Weiden und Ginsberg, 1994; Boyer *et al.*, 1999) welche durch E4orf3 oder E4orf6 kompensiert werden konnten (Weiden und Ginsberg, 1994). Da das Auftreten von Konkateren auch in der Virusmutante

dl1016, der sowohl E4orf3 als auch E1B-55kDa fehlt, beobachtet werden konnte (Stracker *et al.*, 2002), und da das E4orf6-Protein einen multifunktionellen Komplex mit dem E1B-55kDa-Protein bildet (Bridge und Ketner, 1990), nimmt man an, dass sowohl das E4orf3-Protein als auch der E1B-55kDa-E4orf6-Komplex die Verknüpfung der viralen Genome verhindern kann. Unabhängig voneinander hemmt E4orf3 den Multiproteinkomplex, indem es dessen subzelluläre Lokalisation verändert, so dass dieser seine Funktionen nicht mehr erfüllen kann. Der E1B-55kDa-E4orf6-Komplex hingegen verursacht die Degradation des Mre11-Rad50-NBS1-Komplexes. Da der Abbau durch Proteasomeninhibitoren verhindert werden kann, findet die Degradation wie bei p53 über einen Ubiquitin-Proteasomen-abhängigen Weg statt (Stracker *et al.*, 2002).

Um den Einfluss der Mutationen auf die Relokalisation und die Degradation des Mre11-Rad50-NBS1-Komplexes zu testen, wurden A549-Zellen mit 20 ffu/Zelle infiziert (4.3.4), mit Paraformaldehyd fixiert (4.5.8.1) und anschließend immunhistochemisch untersucht (4.5.8.3) (Abb. 27).

Nicht infizierte Zellen (Abb. 27, a2, rechte Zelle) hatten eine diffuse bis punktförmige Verteilung von Mre11 im Kern (mit Aussparung der Nukleoli). Waren die Zellen hingegen mit wt-Ad5 (*pg4100*) infiziert, veränderte sich die Lokalisation von Mre11 hin zu einer primär punktartigen bis fädigen Verteilung im Kern. Auch im *perinuclear body* konnte das Polypeptid nachgewiesen werden. Eine Kolo­kalisierung von E1B und Mre11 konnte vorrangig in diesem Kompartiment gezeigt werden. Auch bei den verschiedenen Virusmutanten war eine Umorganisation von Mre11 zu beobachten, die der des wt-Ad5 entsprach. Ein Einfluss der verschiedenen E1B-Proteine auf die E4orf3-induzierte Relokalisation von Mre11 konnte nicht beobachtet werden. Eine Degradation von Mre11 wie von Stracker *et al.* (2002) für HeLa-Zellen beschrieben wurde konnte in A549-Zellen nicht nachvollzogen werden.

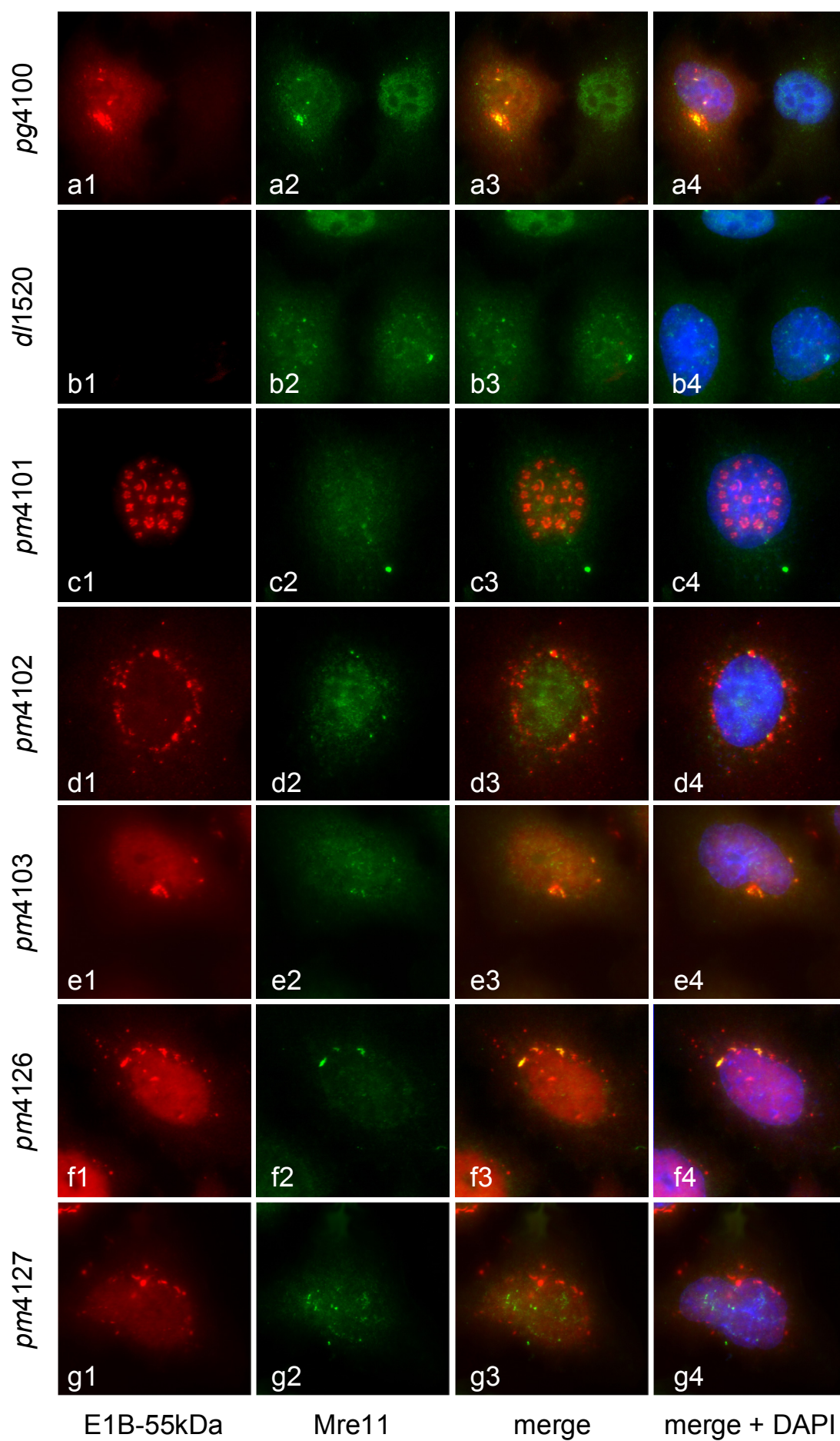


Abb. 27 Immunfluoreszenzanalysen zur Kollokalisierung von E1B-55kDa mit Mre11.

A549-Zellen wurden auf Deckgläser ausgesät und bei einer Konfluenz von 60 % mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert. Die Zellen wurden 20 h.p.i. mit Paraformaldehyd fixiert (4.5.8.1), mit den spezifischen Antikörpern gegen E1B-55kDa (2A6; Maus) und Mre11 (Ratte) inkubiert und mit einem TR-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper bzw. einem FITC-gekoppelten Anti-Ratte-Antikörper nachgewiesen (4.5.8.3). Zusätzlich wurden die Zellkerne mit dem DNA-bindenden Farbstoff DAPI markiert, der eine blaue Fluoreszenz erzeugte. TR-markierte E1B-55kDa-Mutanten (a1 – g1); FITC-markiertes Mre11 (a2 – g2); Überlagerung aus TR-gefärbtem E1B und FITC-markiertem Mre11 (a3 – g3); Überlagerung aus TR-gefärbtem E1B, FITC-markiertem Mre11 und DAPI-Kernfärbung (a4 – g4). Vergrößerung 1000x.

5.2.9 Zusammenfassung der Infektionsversuche

Auch in virusinfizierten Zellen pendelt E1B-55kDa über ein NES und das SKM zwischen Zellkern und Zytoplasma. Mutationen in diesen Motiven führen zu einer dramatischen Umverteilung des adenoviralen Proteins, wobei die E1B-NES-Mutante vorrangig im Kern an den viralen Transkriptions- und Replikationszentren und die SKM-Mutanten präferenziell im Zytoplasma lokalisieren. Mutationen in der potenziellen Ubc9-Bindestelle resultieren in einer ähnlichen Verteilung wie bei der E1B-SKM-Mutante. Veränderungen in der potenziellen Ringfinger-Domäne führen zur Desintegration des *perinuclear body* bei einer ansonsten unveränderten Verteilung. Trotz dieser deutlichen Effekte der Mutationen auf die Lokalisation von E1B-55kDa weisen die entsprechenden Virusmutanten keine erkennbaren Defekte im produktiven Infektionszyklus auf. Eine Beteiligung der Exportfunktion und der putativen Ringfinger-Domäne an der E1B-55kDa-vermittelten Destabilisierung von p53 ist jedoch anzunehmen.

Mutationen des zentralen Cysteins in der BC-Box-Sequenz führen zu keinem veränderten Phänotyp im Vergleich zum wt-Protein. Werden hingegen sowohl das zentrale Cystein als auch das Leucin an Position zwei substituiert resultiert dies in einem sehr instabilen Protein und die entsprechende Mutante verhält sich ähnlich wie die E1B-Deletionsmutante.

6.1 Beitrag potenzieller Strukturmotive im E1B zur E1A-induzierten Transformation

Es ist mittlerweile anerkannte wissenschaftliche Meinung, dass die Adenovirus-vermittelte onkogene Transformation ein vielstufiger Prozess ist, an dem sowohl komplexe Wechselwirkungen viraler und zellulärer Proteine als auch epigenetische Veränderungen, bedingt durch die Insertion der viralen DNA, beteiligt sind.

Nach heutigem Wissensstand vermitteln dabei die Genprodukte der frühen Region 1A (*early region 1A*, E1A) den entscheidenden Schritt der Zelltransformation. Wie mit Hilfe von Transformationsexperimenten herausgefunden wurde, ist die alleinige Expression von E1A für die Immortalisierung und partielle Transformation von Nagerzellen ausreichend (Haley *et al.*, 1984; Moran *et al.*, 1986). Obwohl die Mehrzahl der E1A-immortalisierten Zellen dauerhaft subkultiviert werden können, ist die Transformation unvollständig. Dies zeigt sich darin, dass die Transformanten nicht zu hohen Zelldichten heranwachsen und im Tiermodell nur schwach tumorigen sind (Gallimore *et al.*, 1984). Für eine vollständige Manifestation des transformierten Phänotyps jedoch ist die Koexpression von E1B oder anderen kooperierenden Onkogenen wie z.B. aktiviertes Ha-*ras* (Ruley, 1983) nötig.

Die transformierenden und onkogenen Eigenschaften von E1A in nicht-permissiven Zellen beruhen dabei auf seiner Eigenschaft das normale Zellwachstum zu deregulieren. So stimuliert E1A beispielsweise den Eintritt der Zellen in die S-Phase, um optimale Bedingungen für eine produktive Infektion in nicht-proliferierenden humanen Zellen zu schaffen. Des weiteren moduliert E1A die normalen Funktionen von Schlüsselenzymen, die an Zellzykluskontrolle, dem programmierten Zelltod (Apoptose) und wahrscheinlich am Proteinumsatz beteiligt sind (zur Übersicht: Gallimore und Turnell, 2001). Die Folgen dieser Interaktionen sind, dass E1A eine nicht-fahrplanmäßige DNA-Synthese und Zellproliferation induziert, so dass

primäre Zellen mit einer begrenzten Lebenszeit immortal werden und den Mechanismen der Seneszenz entkommen (Moran, 1994; Shenk, 1996). Im Falle einer abortiven Infektion in nicht-permissiven Nagerzellen hingegen führen diese Wachstums-deregulierenden Funktionen zur Immortalisierung und Transformation.

Ironischer Weise stimulieren jedoch die transformationsfördernden Aktivitäten von E1A gleichzeitig die Apoptose und den Wachstumsstopp der transformierten Zellen und reduzieren damit die transformierende Aktivität von E1A. Nach heutigem Wissensstand beruhen die meisten dieser antiproliferatorischen Aktivitäten auf der E1A-induzierten metabolischen Stabilisierung des Tumorsuppressorproteins p53 (Debbas und White, 1993; Lowe und Ruley, 1993; Grand *et al.*, 1994; Sabbatini *et al.*, 1995). Zusätzlich deuten Untersuchungen darauf hin, dass E1A die Proteasomen-vermittelte Degradation von p53 inhibiert (Turnell *et al.*, 2000).

Diesen proapoptotischen und wachstumshemmenden Eigenschaften von E1A wirken die Genprodukte der E1B-Region entgegen. Obwohl sie selbst kein transformierendes Potenzial besitzen, steigern sie in Kooperation mit E1A beträchtlich die Transformationshäufigkeit und führen zu einem komplett transformierten und malignen Phänotyp. Dabei korreliert die transformationssteigernde Wirkung von E1B-55kDa mit seiner Fähigkeit p53 zu binden und als direkter Transkriptionsrepressor p53-abhängiger Promotoren zu fungieren (Sarnow *et al.*, 1984; Yew und Berk, 1992; Yew *et al.*, 1994). Zusätzlich sequestriert E1B das Tumorsuppressorprotein im *perinuclear body* und führt dabei zu einer räumlichen Inaktivierung von p53. Es wird angenommen, dass diese Funktionen der p53-induzierten Apoptose (Sabbatini *et al.*, 1995; Teodoro und Branton, 1997) und/oder dem p53-abhängigen Zellzyklusarrest (Shepherd *et al.*, 1993; Hutton *et al.*, 2000) entgegenwirkt.

Mittlerweile konnte auch für Ad5 E4orf6 ein transformierendes und onkogenes Potenzial gezeigt werden. In Kooperation mit E1A und E1B ist E4orf6 in der Lage die *Focus*-Bildung von primären Rattenzellen zu verstärken (Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997; Nevels *et al.*, 1999a) und zur vollständigen onkogenen Transformation

beizutragen. Der hochgradig transformierte, E4orf6-assoziierte Phänotyp korreliert dabei mit einer dramatischen Reduktion der p53-Mengen. Anscheinend wirken E4orf6 und E1B-55kDa kooperativ der E1A-induzierten Stabilisierung von p53 entgegen, indem p53 verstärkt dem proteosomalen Abbau zugeführt wird (Grand *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997; Querido *et al.*, 1997; Roth *et al.*, 1998; Steegenga *et al.*, 1998; Nevels *et al.*, 1999a; Boyer und Ketner, 2000; Cathomen und Weitzman, 2000; Wienzek *et al.*, 2000; Querido *et al.*, 2001b). Neuere Untersuchungen zeigen, dass E4orf6 Teil eines Multienzymkomplexes aus Cullin 5, Elongin B und C und dem Ring-H2-finger Protein Rbx1 ist (Querido *et al.*, 2001b). Dieser Komplex zeigt auffällige Ähnlichkeiten zum von Hippel-Lindau (VHL)-Tumorsuppressor-komplex und zum SCF (Skp1-Cul1/Cdc53-F-Box) E3 Ubiquitinligasekomplex und ist in der Lage In-vitro die Ubiquitylierung von p53 zu stimulieren (Querido *et al.*, 2001b).

6.1.1 BC-Box

Mit Hilfe von Datenbankvergleichen der verschiedenen E1B-55kDa-Proteine aller bekannten humanen Adenovirusgruppen wurden zwei stark konservierte Motive identifiziert. Es handelte sich dabei zum einen um das BC-Box-Motiv (5.1.1), an das via Elongin C der Elongin BC-Komplex binden könnte. Interessanterweise sind Elongin B und C Bestandteile des von Querido und Mitarbeitern (2001b) postulierten Multienzymkomplexes, der In-vitro für die Ubiquitylierung von p53 verantwortlich ist. Obwohl E4orf6 alle Komponenten des Komplexes unabhängig von E1B binden kann, ist die Degradation von p53 in CHO-Zellen (Querido *et al.*, 2001b) und in H1299-Zellen (diese Arbeit) E1B-abhängig. Eine mögliche Funktion dieses Motivs im E1B könnte demnach mit der räumlichen Organisation der verschiedenen Bestandteile des Multienzymkomplexes zusammenhängen. Mutationsanalysen im BC-Box-Motiv zeigen, dass die Substitution des zentralen Cysteins durch Threonin (BC-3) keinen Einfluss auf die Funktionen des Proteins bei der Transformation hat (5.1.3). Auch die Expression und die Lokalisation des Polypeptides sowie die Interaktionen mit p53 sind wie beim wt-Protein (5.1.4, 5.1.5, 5.1.6). Es kann daraus gefolgert werden, dass der entsprechende Austausch die

Funktion des Motivs nicht beeinträchtigt. Dies stimmt gut mit Untersuchungen am von Hippel-Lindau-Protein überein, bei denen durch Kristallstrukturanalysen die Bindung von Elongin C an die BC-Box auf die Interaktion mit dem Leucin an Position zwei des Motivs kartiert wurde (Stebbins *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu waren die Mutanten, bei denen sowohl das zentrale Cystein als auch das konservierte Leucin an Position zwei ausgetauscht wurden (BC-1 und BC-2), deutlich in ihrer Fähigkeit eingeschränkt in Kooperation mit E1A die Transformations-effizienz zu stimulieren (5.1.3). Diese Verringerung des transformierenden Potenzials stimmt gut mit der verminderten Repression der p53-abhängigen Promotoren überein (5.1.6.1). Da diese Mutanten nicht in der Lage waren eine Aktivierung eines p53-abhängigen Promotorelements zu reprimieren, ist die verminderte Transformationseffizienz durch p53-induzierte Prozesse wie Apoptose oder Zellzyklusarrest zu erklären. Der Grund für die verminderte Repression durch BC-1 und BC-2 könnte sowohl mit der veränderten Lokalisation (5.1.5) der entsprechenden Mutanten-Proteine als auch durch eine Verringerung der Gleichgewichtsmengen, wie sie in den stabil transformierten Zelllinien zu beobachten war (5.1.4), erklärt werden. Unterstützung für einen ursächlichen Defekt durch die veränderte Lokalisation kommt aus Untersuchungen einzelner Aminosäureaustausche im E1B-55kDa. H260A, eine Virusmutante die nur sehr schwach mit p53 interagiert (Shen *et al.*, 2001), zeigt eine normale Verteilung von E1B, jedoch mit Aussparung des perinukleären Kompartiments (diese Arbeit, Daten nicht gezeigt). Auch für die Linkerinsertionsmutante H180, bei der vier zusätzliche Aminosäuren zwischen dem konservierten Leucin und Cystein eingeführt wurden, ist ein Defekt bei der Bindung des Tumorsuppressors beschrieben worden (Yew *et al.*, 1990). Somit kann spekuliert werden, dass BC-1 und BC-2 nicht mehr im *perinuclear body* lokalisieren, da sie die Fähigkeit verloren haben effektiv mit p53 wechselzuwirken. Ob diese Mutationen im E1B auch mit einer Veränderung oder Inaktivierung des Cullin-enthaltenden E1B/E4orf6-Multienzymkomplexes einhergeht muss noch geklärt werden.

6.1.2 Ringfinger-Motiv

Durch Vergleichen der Primärsequenzen der verschiedenen E1B-55kDa-Proteine konnte eine zweite konservierte Region im Polypeptid identifiziert werden. Diese zeichnet sich besonders durch die hohe Anzahl an identischen Cysteinen und Histidinen aus (Abb. 5). Das gehäufte Auftreten von Cysteinen und Histidinen ist insofern interessant, da sie an der Komplexierung von zweiwertigen Zinkionen beteiligt sind, wie z.B. beim klassischen Zinkfinger.

1991 wurde erstmals ein weiteres Zink-bindendes Protein beschrieben, das jedoch kein bekanntes Zn^{2+} -Bindemotiv besaß. Untersuchungen des als RING1 (*really interesting new gene 1*) bezeichneten Proteins führten zur Identifizierung einer neuen cysteinreichen Region, die als Ringfinger oder C3HC4-Finger bezeichnet wurde und in einer Vielzahl vormals nicht-verwandter Proteine entdeckt wurde (zur Übersicht: Saurin *et al.*, 1996). Das Motiv wurde im Laufe der Zeit besonders in Bezug auf den Abstand der einzelnen Cysteine und Histidine und die zusätzliche Verwendung von Asparagin, Asparaginsäure und Threonin als Metall-Bindestellen erweitert. Ringfinger-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Entwicklung, Onkogenese, Apoptose und bei der viralen Replikation (zur Übersicht: Saurin *et al.*, 1996; Borden, 2000; Jackson *et al.*, 2000). Die einzige Gemeinsamkeit der Ring-Domänen scheint dabei die Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen zu sein.

Obwohl keine der postulierten Ringfinger-Konsensussequenzen exakt im E1B-55kDa enthalten ist, liegt die Vermutung nahe – gerade in Bezug auf die hohe Variabilität des Motivs – dass es sich bei E1B ebenfalls um ein vergleichbares Motiv handeln könnte. Mit Hilfe von E1B-Punktmutanten an den potenziellen Metall-Bindestellen des Motivs wurde diese Hypothese überprüft und die entsprechenden mutierten Proteine bezüglich ihres transformierenden Potenzials (5.1.3), ihrer Expression und Lokalisation (5.1.4, 5.1.5) und ihrer Interaktion mit p53 (5.1.6) untersucht.

Auf Grund der gewonnen Daten lassen sich die sechs individuellen Proteinmutanten in drei Gruppen einteilen. RF-5, das einzige Mitglied der ersten Gruppe, ist in der

Lage die E1A-induzierte Transformation deutlich, wenn auch nicht wie das wt-Protein, zu stimulieren. Passend zu der Hypothese, dass E1B durch seine p53-inhibierende Wirkung zur Transformation beiträgt, kann RF-5 auch die Repression des p53-abhängigen Promotorelements stimulieren. Auffälligerweise trägt das Protein jedoch zur Desintegration des *perinuclear body* bei, obwohl es sonst wie das wt-Protein verteilt ist. Es kann daher spekuliert werden, dass der Unterschied in der Transformationseffizienz von RF-5 zum wt-E1B durch die Zerstörung der Integrität des kernständigen Kompartiments determiniert ist. Eine weitere Möglichkeit die verminderte Transformationseffizienz zu erklären ist eine leicht reduzierte Affinität von RF-5 zu p53. Unterstützt wird diese Überlegung durch die Tatsachen, dass RF-5 in Abwesenheit von E4orf6 p53 nicht stabilisieren kann und einen leichten Defekt bei der Repression der p53-Transaktivierung zeigt.

Die zweite Gruppe von Ringfinger-Mutanten (RF-2 und RF-4) zeichnet sich durch eine dramatische Verringerung der p53-Transaktivierungsrepression aus. Im Gegensatz zur vorherigen Gruppe stabilisieren beide Mutanten p53 in Abwesenheit von E4orf6. Somit muss argumentiert werden, dass die deutlich verringerte Transformationseffizienz nicht durch die abgeschwächte p53-Interaktion, sondern durch die Unfähigkeit p53-abhängige Promotoren zu reprimieren, determiniert ist. Obwohl RF-2 und RF-4 in der Lage sind p53 in Abwesenheit von E4orf6 wie das wt-Protein zu stabilisieren, kann auf Grund der geringen Expressionsmengen der beiden Proteine in den stabil transformierten Zelllinien ein Einfluss der verminderten Stabilität nicht ausgeschlossen werden. Auch Virusmutanten mit einer vier Aminosäuren langen Linkerinsertion an den Positionen 354 und 380 des E1B-Polypeptides zeichnen sich durch eine verringerte Stabilität aus, was zu der Hypothese führte, dass dieser zentrale Sequenzbereich wichtig für die korrekte Faltung des adenoviralen Proteins ist und so zu seiner Stabilität beiträgt (Yew *et al.*, 1990; Gabler *et al.*, 1998; Gonzalez und Flint, 2002).

Die dritte und zugleich interessanteste Gruppe besteht aus RF-1, RF-3 und RF-6. Obwohl alle drei Proteine die Transaktivierung p53-abhängiger Promotoren noch zu 85 -90 % reprimieren können ist ihr Beitrag zur Transformation in Kombination

mit E1A alleine und mit E1A und E4orf6 in Kombination nahezu Null. Mit Ausnahme von RF-3, das eine Mutation im zentralen Bereich des E1B-Proteins hat und eine verringerte Stabilität zeigt, können die Proteine in Abwesenheit von E4orf6 p53 stabilisieren. Die dramatischen Defekte bei der Stimulierung der E1A-induzierten Transformation lassen sich also nicht mit einer Veränderung der p53-Interaktion erklären. Diese Mutanten widersprechen damit zum ersten Mal der Annahme, dass E1B alleine über seine p53-inaktivierende Wirkung zur vollständigen Transformation beiträgt. Auch die Tatsache, dass zumindest RF-1 und RF-6 die Integrität des *perinuclear body* beeinträchtigen, kann nicht als exklusiver Erklärungsansatz herangezogen werden, da die Verteilung des restlichen E1Bs dem des wt-Proteins entspricht. Vielmehr deuten die gewonnenen Ergebnisse auf die Beteiligung eines oder mehrerer, zusätzlicher, p53-unabhängiger Faktoren hin, die in Wechselwirkung mit E1B zur Stimulierung der E1A-induzierten Transformations-effizienz beitragen.

Weiterhin auffällig ist bei dieser Gruppe, dass einzelne Mutationen, die mehr als 150 Aminosäuren voneinander entfernt sind, die gleichen ungewöhnlichen Phänotypen zeigen. Ausgehend von der Annahme, dass die gezeigten Defekte auf der fehlerhaften Interaktion mit einem weiteren Faktor beruhen, muss von einer sehr großen, räumlich koordinierten Domäne ausgegangen werden. Diese Überlegung betont somit die Möglichkeit, dass es sich bei dem putativen Ringfinger-Motiv tatsächlich um ein funktionelles Strukturmotiv handelt.

6.2 Einfluss von E1B während der produktiven Infektion

Untersuchungen der letzten Jahre in zahlreichen Arbeitsgruppen zeigten, dass das E1B-55kDa-Protein von Ad5 ein multifunktionelles Polypeptid ist, das viele wichtige Funktionen während der Virusreplikation hat.

Einiges deutet darauf hin, dass E1B-55kDa durch die Bindung von p53 in der frühen Phase der Infektion den p53-induzierten programmierten Zelltod (Apoptose) und

Wachstumsstopp inhibiert. E1B reprimiert dazu die Transaktivierung p53-abhängiger Promotoren (Sarnow *et al.*, 1982a; Kao *et al.*, 1990; Yew und Berk, 1992; Yew *et al.*, 1994; Martin und Berk, 1998) und dirigiert, in Kombination mit E4orf6, das Tumorsuppressorprotein in den Ubiquitin-abhängigen proteolytischen Abbauweg (Grand *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997; Querido *et al.*, 1997; Ridgway *et al.*, 1997; Steegenga *et al.*, 1998; Boyer und Ketner, 2000; Nevels *et al.*, 2000; Wienzek *et al.*, 2000).

In der späten Phase der Infektion wird E1B sowohl für den effizienten Transport der späten viralen mRNAs ins Zytoplasma und deren Translation (Beltz und Flint, 1979; Babich *et al.*, 1983; Babiss und Ginsberg, 1984; Babiss *et al.*, 1985; Pilder *et al.*, 1986) als auch für das Abschalten der zellulären Proteinsynthese (*host shut-off*) benötigt (Anderson *et al.*, 1973; Beltz und Flint, 1979). HeLa-Zellen, die mit einer E1B-defizienten Virusmutante infiziert wurden, zeigten eine verringerte Konzentration zytoplasmatischer später viraler mRNAs, in erster Linie weil der selektive Export der viralen mRNAs bei gleichzeitiger Inhibition des zellulären RNA-Exports nicht induziert wird (Babiss *et al.*, 1985; Pilder *et al.*, 1986; Williams *et al.*, 1986; Leppard und Shenk, 1989; Leppard, 1993). Untersuchungen der entsprechenden Virusmutanten zeigten, dass E1B-55kDa eine intranukleäre Reaktion der späten viralen mRNA-Produktion unterstützt, in dem es die Freisetzung der späten RNA aus der nukleären Matrix in die lösliche nukleäre Fraktion fördert (Leppard und Shenk, 1989). Da die Mehrheit der mRNAs in der löslichen Fraktion richtig prozessiert waren, wurde daraus geschlossen, dass E1B eine geschwindigkeitsbestimmende intranukleäre Reaktion stimuliert, die für einen effizienten Export der viralen mRNA benötigt wird (Leppard und Shenk, 1989). Zusätzlich wurde für Ad2-infizierte Zellen berichtet, dass dort keine zellulären mRNAs in der löslichen Kernfraktion detektiert werden konnten, sondern durch späte virale mRNAs ersetzt waren (Denome *et al.*, 1989). Obwohl eine Beteiligung von E1B nicht untersucht wurde, deutet diese Beobachtung darauf hin, dass ein einzelner E1B-abhängiger Prozess zugleich den viralen mRNA-Export als auch die Inhibition des zellulären mRNA-Transports stimuliert.

6.2.1 Etablierung eines direkten Klonierungssystems für Ad5-Virusmutanten

Um den Einfluss verschiedener Domänen des E1B-55kDa-Proteins während der produktiven Infektion zu untersuchen, sollten entsprechende Virusmutanten hergestellt werden. Bereits etablierte Systeme zur Herstellung von Adenovirusmutanten basieren auf der homologen Rekombination in Bakterienzellen (Chartier *et al.*, 1996; He *et al.*, 1998), wobei gerade die Benutzung eines rekombinationskompetenten *E. coli* Stammes aber oftmals zu unerwünschten Veränderungen in der DNA-Sequenz (z.B. Deletionen) führt. Aus diesem Grund sollte ein neues System entwickelt werden, mit dem es möglich war, schnell und effizient Punktmutanten im adenoviralen Genom zu erzeugen. In Zusammenarbeit mit Peter Groitl aus unserer Arbeitsgruppe wurde ein System entwickelt und etabliert, bei dem die schnelle zielgerichtete Veränderung der E1-Region mit dem direkten Klonieren in das 36 kb große Ad5-Genom kombiniert wurde (5.2.1). Mit diesem neuen rekombinationsfreien Klonierungssystem wurden im Anschluss die entsprechenden Virusmutanten hergestellt.

6.2.2 Effekte von Mutationen in der BC-Box oder im Ringfinger-Motiv

Die Mutationen im putativen Ringfinger-Motiv haben keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten frühen viralen Proteine E1B-55kDa und E2A-72kDa. Auch die Initiation der viralen DNA-Synthese und die Produktion der späten Strukturproteine (sowohl die Gleichgewichtsmengen als auch die Syntheseraten) sind in den Virusmutanten unbeeinflusst. Dagegen weisen die Ringfinger-Mutanten leicht erhöhte Gleichgewichtsmengen von p53 auf. Es ist also anzunehmen, dass diese Bereiche durch einen noch unbekannten Mechanismus zur Destabilisierung des Tumorsuppressors beitragen. Da die Verteilung bekannter E1B-interagierender Proteine unbeeinflusst ist (5.2.8), kommt in diesem Zusammenhang der durch die Mutationen ausgelösten Desintegration des *perinuclear body* eine besondere Bedeutung zu. Möglicherweise wird durch die Mutationen im putativen Ringfinger-Motiv des E1B-55kDa-Proteins eine Aktivität beeinträchtigt oder zerstört, die zugleich für die Destabilisierung von p53 als auch für die Aufrechterhaltung der

Integrität des perinukleären Kompartiments benötigt wird. Gerade weil es sich hier um eine putative Ringfinger-Domäne handelt, welche allgemein im Kontext von Protein-Protein-Interaktionen und dem Aufbau hochmolekularer Proteinkomplexe gesehen wird (zur Übersicht: Borden, 2000), ist eine fehlerhafte Wechselwirkung zu einem bisher nicht bekannten Protein anzunehmen.

Anders ist die Situation bei den BC-Box-Mutanten. Während ein Austausch des konservierten Cysteins an der Position sechs des BC-Box-Motivs gegen ein Threonin zu keiner Veränderung der untersuchten Aktivitäten im Vergleich zum wt-Protein führt, verhält sich die doppeltsubstituierte BC-Box-Mutante *pm4125*, bei der kein E1B-55kDa nachgewiesen werden kann, wie die E1B-Deletionsmutante *dl1520*. Dies bestätigt die Ergebnisse der stabil transformierten BRK-Zelllinien. Auch im viralen Kontext führt die alleinige Substitution C184T (*pm4124*) zu keinem defekten Protein. Auch Untersuchungen des Hippel-Lindau-Proteins, bei denen die Interaktion von Elongin C mit der BC-Box auf das konservierte Leucin an Position zwei kartiert wurde (Stebbins *et al.*, 1999), deuten darauf hin, dass das zentrale Cystein ersetzbar ist. Desweiteren wurde im Elongin C eine hydrophobe Tasche im C-terminalen Bereich des Polypeptids identifiziert, die mit der BC-Box wechselwirkt (Stebbins *et al.*, 1999). Dies unterstützt die Vermutung, dass an dieser Position (C184) nicht eine bestimmte Aminosäure sondern das räumliche Milieu für die Bindung wichtig ist. Sind hingegen sowohl das Leucin an Position zwei als auch das Cystein an Position sechs durch konservative Aminosäureaustausche ersetzt, führt dies zu einer dramatischen Reduktion der E1B-Gleichgewichtsmengen mit dem Phänotyp eines E1B-deletierten Virus. Wie durch die Virusmutante *pm4124* gezeigt, kann der Austausch des zentralen Cysteins (bei *pm4125* durch ein Serin, bei *pm4124* durch ein Threonin) nicht der Grund für die veränderte Stabilität sein. Vielmehr ist anzunehmen, dass hierfür die Substitution des Leucins die Ursache ist, was im Umkehrschluss für eine wichtige Bedeutung des BC-Box-Motivs im E1B spricht.

6.2.3 Effekte der Mutationen im Pendelmotiv des E1B

6.2.3.1 Subzelluläre Lokalisation von E1B-55kDa

Frühere Transfektions- und Heterokaryon-Versuche am isolierten E1B-55kDa-Protein ergaben, dass E1B ein nukleozytoplasmatisches Pendelprotein ist. Der nukleäre Export wird dabei durch ein leucinreiches nukleäres Exportsignal (NES) vom HIV Rev-Typ vermittelt (Krätzer *et al.*, 2000; Dosch *et al.*, 2001). Eine effiziente Akkumulation des Proteins im Kern ist von der Konjugation des *small ubiquitin-related modifier protein 1* (SUMO-1) abhängig (Endter *et al.*, 2001; Endter, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Virusmutanten im NES-Motiv und im SUMO-Konjugationsmotiv von E1B-55kDa hergestellt. Zum ersten Mal konnte ein Einfluss dieser Motive auf die subzelluläre Lokalisation von E1B in virusinfizierten Zellen beobachtet werden. Mutationen im NES verhindern den nukleären Export von E1B-55kDa und es kommt zur Akkumulation des Polypeptids im Zellkern. Dieses Motiv ist also notwendig und ausreichend um den Transport des E1B-Proteins vom Zellkern ins Zytoplasma zu ermöglichen. In der späten Phase der Infektion lokalisiert E1B-55kDa an der Peripherie der viralen Transkriptions- und Replikationszentren. E1B kolokalisiert also transient mit den Orten der viralen mRNA-Synthese bevor es den Zellkern verlässt. Dies könnte in Zusammenhang mit der Beobachtung stehen, dass E1B-55kDa eine intranukleäre Reaktion der späten viralen mRNA-Produktion unterstützt, indem es die Freisetzung der späten RNA aus der nukleären Matrix in die lösliche nukleäre Fraktion fördert (Leppard und Shenk, 1989).

Im Gegensatz dazu führt die Mutation in der SUMO-Akzeptorstelle zur zytoplasmatischen Anhäufung des adenoviralen Proteins. Diese Ansammlung von E1B im Zytoplasma kann aber das Resultat zweier unabhängiger Prozesse sein: (i) E1B kann nicht mehr importiert werden und (ii) E1B kann nicht mehr im Kern zurückgehalten werden. Kürzlich wurde gezeigt, dass E1B mit Importin $\alpha 1$, einem Schlüsselenzym des zellulären Kernimports, interagiert (Harada *et al.*, 2002). Immunpräzipitationsanalysen zur Wechselwirkung von E1B-SKM-Mutante *pm4102* mit Importin $\alpha 1$ ergaben, dass sowohl das wt-Protein als auch die SKM-Mutante in gleichem Maße an das Import-Protein binden (diese Arbeit, Daten nicht gezeigt).

Eine fehlerhafte Wechselwirkung mit dem Importprotein kann demzufolge nicht der Grund für die zytoplasmatische Anhäufung des E1B-Proteins sein. Weitere Unterstützung für einen Kernretentionsdefekt der SKM-Mutante ergaben die Untersuchung der SKM/NES-Doppelmutante *pm4103*. In dieser Virusmutante ist E1B, ähnlich wie in den wt-infizierten Zellen, sowohl im Zytoplasma als auch im Kern verteilt. Würden Defekte in der SUMO-Modifikation Auswirkungen auf den Kernimport haben, dann dürfte auch die Doppelmutante nicht im Kern zu detektieren sein. Auch die E1-Proteine von HPV-11 und BPV werden SUMOyliert, wobei diese Reaktion zur Retention der E1-Proteine im Zellkern beiträgt (Rosa-Acosta und Wilson, persönliche Mitteilung).

Neben der Retention im Kern könnte die SUMO-Modifikation zusätzlich eine Rolle bei der Steuerung des viralen Proteins zu spezifischen Regionen innerhalb des Zellkerns spielen. Durch die SUMOylierung könnte sich die Affinität des E1B-55kDa-Proteins zu zellulären Proteinen verändern und dadurch zum Beispiel eine Wechselwirkung mit Komponenten der Chromatinfraction herbeiführen. Auch das zelluläre Protein Sp100 kann mit Chromatin wechselwirken, indem es an Mitglieder der HP1 (Heterochromatin Protein 1)-Familie bindet. Diese Interaktion wird durch die SUMOylierung des Sp100-Proteins vermittelt und stabilisiert (Sternsdorf *et al.*, 1999; Seeler *et al.*, 2001). Mit Hilfe subzellulärer Fraktionierung Virusmutanten-infizierten HeLa-Zellen wurde gezeigt, dass reduzierte Mengen des SKM-mutierten E1B-Proteins in der Chromatinfraction nachzuweisen waren (Kindsmüller, 2002). Ob dieser Defekt aber direkt auf einer verminderten Interaktion mit der Chromatinfraction beruht oder durch die geringen Mengen von E1B-SUMO im Kern determiniert ist muss noch geklärt werden.

Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang, dass das NES-Motiv und die SUMO-Konjugationsstelle nur wenige Aminosäuren voneinander getrennt sind. Es besteht also die Möglichkeit, dass durch die kovalente Bindung des ca. 20 kDa großen SUMO-1-Proteins die nukleäre Exportsequenz maskiert wird und somit die SUMO-Konjugation indirekt zur Retention/Relokalisation von E1B im Kern führt. Erst nachdem SUMO-1 durch ein dekonjugierendes Enzym von E1B abgespalten

wurde, wäre nach dieser Hypothese die NES-Sequenz wieder frei und das Polypeptid könnte exportiert werden. Wenn nun aber die SUMO-Modifikation einzig für die Retention im Nukleus und nicht für den Kernimport des Proteins wichtig ist und da passive Diffusion durch die Kernporen nur bis zu einem Molekulargewicht von ungefähr 40 kDa stattfindet, müssen zusätzliche Mechanismen bestehen, die E1B in den Kern dirigieren. Dabei könnten sowohl das viel diskutierte nukleäre Lokalisationssignal (NLS) von E1B (Krätzer *et al.*, 2000) als auch die Wechselwirkung mit anderen viralen Proteinen (insbesondere E4orf3 und E4orf6) von Bedeutung sein.

Ebenso wie die SKM-Mutanten *pm4102* und *pm4104* akkumuliert die an der mutmaßlichen Ubc9-Bindestelle mutierte Virusvariante *pm4105* vorrangig im Zytoplasma. Auch die Doppelmutante Ubc9/NES (*pm4106*) ist wie SKM/NES (*pm4103*) verteilt, was die Vermutung einer direkten Beteiligung dieser Sequenz an der subzellulären Lokalisation von E1B unterstützt. Ubc9, das einzige momentan bekannte E2-konjugierende Enzym der SUMOylierungsreaktion, ist maßgeblich an diesem Prozess beteiligt und kann in vielen Fällen durch direkte Wechselwirkung mit dem Zielprotein und ohne Beteiligung einer substratspezifischen E3-Ligase diese Reaktion katalysieren (zur Übersicht: van Wilson und Rangasamy, 2001). Obwohl eine Beteiligung von Ubc9 an der SUMOylierung von E1B nicht nachgewiesen wurde, deuten sowohl der Phänotyp der Ubc9-Einzelmutante als auch der der Ubc9/NES-Doppelmutante im Vergleich zu den entsprechenden SKM-Mutanten auf eine derartige Aktivität hin.

6.2.3.2 Auswirkungen auf den produktiven Infektionszyklus

Obwohl Mutationen im Pendelmotiv von E1B zu einer dramatischen Veränderung der subzellulären Lokalisation führen, haben die entsprechenden Virusmutanten keine gravierenden Defekte während der frühen Phase der Infektion. Interessanterweise ist jedoch der Abbau von p53 speziell in der E1B-NES-Mutante (*pm4101*) leicht beeinflusst und es können erhöhte Gleichgewichtsmengen detektiert werden (5.2.4). Dies deutet darauf hin, dass der nukleäre Export des E1B-55kDa-

Proteins wichtig für die vollständige Destabilisierung des Tumorsuppressors ist. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch bei der Untersuchung der Stabilität von p53 mit verschiedenen E4orf6-Mutanten gemacht. Eine Mutation im E4orf6-NES führt ebenfalls zu einer verminderten Degradation von p53 (Nevels *et al.*, 2000). Auch die Ergebnisse der Destabilisierung von p53 durch das virale E6-Protein der hochrisiko Papillomviren HPV16 und HPV18 (Freedman und Levine, 1998) und durch den zellulären Antagonisten des p53-Proteins hdm2 (Roth *et al.*, 1998; Tao und Levine, 1999; Ryan *et al.*, 2001) deuten auf eine Beteiligung des nukleären Exports bei der p53-Destabilisierung hin.

Die frühe und die späte Phase des produktiven Infektionszyklus sind durch das Einsetzen der viralen DNA-Synthese getrennt. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die untersuchten Virusmutanten im Pendelmotiv zum gleichen Zeitpunkt wie das wt-Virus und das E1B-deletierte Virus *dl1520* die virale DNA-Synthese initiieren, was auf einen vergleichbaren Ablauf der frühen Infektionsphase hindeutet. Zusammen mit früheren Untersuchungen (Goodrum und Ornelles, 1997, 1998) weist dies darauf hin, dass das E1B-55kDa-Protein seine für die virale Replikation entscheidenden Funktionen erst nach dem Einsetzen der viralen DNA-Synthese in der späten Phase des Replikationszyklus ausübt.

Adenovirus-Mutanten, die kein funktionsfähiges E1B-Protein exprimieren, zeigen Defekte beim *host shut-off*, bei der Synthese viraler Strukturproteine und bei der Produktion von Nachkommenviren (Babiss *et al.*, 1985; Pilder *et al.*, 1986; Yew *et al.*, 1990). Ein Grund dieser Defekte ist das Unvermögen der E1B-deletierten Mutanten, in der späten Phase der Infektion den selektiven Transport viraler mRNA vom Kern ins Zytoplasma zu fördern (Pilder *et al.*, 1986; Leppard und Shenk, 1989). Da sich das E1B-55kDa-Protein mit Hilfe des NES (Krätzer *et al.*, 2000; Dosch *et al.*, 2001) und der SUMO-Modifikation (Endter *et al.*, 2001; Endter, 2002) zwischen Zellkern und Zytoplasma bewegen kann, nimmt man an, dass diese Pendelaktivität eine zentrale Rolle beim viralen mRNA-Transport spielt. Mit Hilfe der Virusmutanten im Pendelmotiv wurde untersucht, welchen Einfluss das NES und die SUMO-Modifikation auf die virale Replikation haben. Es konnte jedoch kein deutlicher

Effekt beim Abschalten der zellulären Proteinexpression, bei der Synthese später viraler Strukturproteine und bei der Produktion von Nachkommenviren festgestellt werden. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die geringen Mengen an E1B-55kDa, die sich bei der NES-Mutante im Zytoplasma bzw. bei den SKM-Mutanten im Zellkern befinden, für die Ausübung der Funktionen in den jeweiligen Kompartimenten ausreichend sind. Als initialer Bestandteil könnten bereits geringe Mengen an E1B-55kDa, zum Beispiel über die Aktivierung von Proteinphosphatasen, die Translation regulieren, die dann den Initiationsfaktor eIF-4F dephosphorylieren. Dies würde erklären, warum bei den verschiedenen Virusmutanten kein auffälliger Defekt beim Abschalten der zellulären Genexpression festgestellt werden konnte. Zusätzlich könnten auch ein oder mehrere virale Proteine die Mutationen des E1B kompensieren. Ein möglicher Kandidat hierfür wäre das multifunktionelle E4orf6-Protein. E4orf6 hat redundante Funktionen zu E1B und ist ebenfalls für die Expression später viraler Gene, für das Abschalten der zellulären Proteinsynthese, sowie für die Produktion von Nachkommenviren wichtig (Halbert *et al.*, 1985; Weinberg und Ketner, 1986; Huang und Hearing, 1989; Bridge und Ketner, 1990). Virusmutanten, die kein funktionelles E4orf6-Protein exprimieren, weisen deshalb einen ähnlichen Phänotyp wie E1B-deletierte Viren auf (Halbert *et al.*, 1985; Sandler und Ketner, 1991).

Das E4orf6-Protein kann wie E1B-55kDa an das Tumorsuppressorprotein p53 binden und so dessen transaktivierende Aktivität blockieren (Dobner *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997; Rubenwolf *et al.*, 1997). Zudem ist E4orf6 in Kooperation mit E1B in der Lage, die Halbwertszeit einiger zellulärer Proteine, wie z.B. p53 und Mre11 herabzusetzen, indem es diese Proteine dem Ubiquitin-abhängigen, proteolytischen Abbau zuführt (Moore *et al.*, 1996; Querido *et al.*, 1997; Roth *et al.*, 1998; Steegenga *et al.*, 1998; Nevels *et al.*, 1999a; Cathomen und Weitzman, 2000; Querido *et al.*, 2001b; Querido *et al.*, 2001a; Stracker *et al.*, 2002). Zudem erhöht das E4orf6-Protein die Stabilität der späten viralen mRNAs im Zellkern (Bridge und Ketner, 1989; Sandler und Ketner, 1989) und bewirkt im Komplex mit dem E1B-55kDa-Protein den selektiven Export viraler mRNAs ins Zytoplasma, während zelluläre Transkripte im

Zellkern zurückgehalten werden (Babiss *et al.*, 1985; Halbert *et al.*, 1985; Pilder *et al.*, 1986; Cutt *et al.*, 1987; Huang und Hearing, 1989; Bridge und Ketner, 1990). Das E4orf6-Protein besitzt wie E1B-55kDa ein NES und zusätzlich ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS), die den Kernexport und -import des E4orf6-Proteins ermöglichen (Dobbelstein *et al.*, 1997). Mit einem Transfektions-Infektions-System konnte gezeigt werden, dass Mutationen im E4orf6-NES zu einer verminderten Produktion von Hexonproteinen und viralen Nachkommen führen (Weigel und Dobbelstein, 2000). Es gibt jedoch widersprüchliche Aussagen über die Funktionalität des E4orf6-NES (Dobbelstein *et al.*, 1997; Krätzer *et al.*, 2000; Weigel und Dobbelstein, 2000). Da ein Komplex aus E1B-55kDa und E4orf6 für den nukleozytoplasmatischen Transport viraler mRNAs zuständig ist, könnte es sein, dass das E4orf6-NES den Verlust des E1B-55kDa-NES kompensieren kann. Es ist außerdem bekannt, dass die Lokalisation des E1B-55kDa-Proteins in Transfektionsversuchen von E4orf6 abhängig ist. Das E4orf6-Protein führt dabei zur nukleären Akkumulation von E1B-55kDa und ist zudem an der Assoziation des E1B-Proteins mit den viralen Replikations- und Transkriptionszentren beteiligt (Ornelles und Shenk, 1991). Folglich könnte der Verlust der SUMO-Modifikation des E1B-Proteins, und somit ein Defekt in der effizienten Akkumulation im Kern zumindest teilweise durch das E4orf6-Protein kompensiert werden.

Um die genauen Funktionen des E1B-55kDa-NES und des E4orf6-NES bei der viralen Replikation zu überprüfen, wäre es nun wichtig, die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit einer Virusmutante, bei der sowohl das NES des E1B-55kDa-Proteins, als auch das des E4orf6-Proteins mutiert sind, zu wiederholen.

Gerade im Hinblick auf die mögliche Kompensation der Defekte der E1B-Virusmutanten durch E4orf6 und unter Umständen auch durch E4orf3, ist es wichtig, die Mutationen im Pendelmotiv, in der BC-Box-Sequenz und in der putativen Ringfinger-Domäne im Hintergrund eines E4orf6 und/oder E4orf3 deletierten Virusmutante zu testen. Untersuchungen entsprechender Virusmutanten liefern sicherlich wertvolle Einsichten in die genauen Funktionen von E1B im produktiven Infektionszyklus.

6.3 Ausblick

Auch im Hinblick auf die Weiterentwicklung eines adenoviralen Vektorsystems für die Immuntherapie scheint die weitere Analyse dieser Virusmutanten von besonderem Interesse. Untersuchungen adenoviraler Vektoren haben gezeigt, dass der lytische Infektionszyklus von Ad5 durch Mutationen in den E1B, E4orf3 und E4orf6-Genen ganz oder teilweise auf Tumorzellen restringiert werden kann. Der prominenteste Vertreter dieser Vektorgruppe ist ONYX-015 (Bischoff *et al.*, 1996). Die Replikation und Zelllyse dieses ursprünglich als *dl1520* bezeichneten Virus soll selektiv auf Tumorzelltypen beschränkt sein, denen ein funktionelles p53 fehlt (Bischoff *et al.*, 1996; Ries *et al.*, 2000). Da ungefähr die Hälfte aller menschlichen Tumore einen Defekt in der p53-Funktion aufweisen, könnte ONYX-015 ein wirksames Mittel gegen maligne Erkrankungen darstellen (Dix *et al.*, 2001). Es gibt jedoch eine Reihe von Veröffentlichungen, in denen bezweifelt wird, dass die selektive Replikation von ONYX-015 vom p53-Status der Zelle abhängig ist. Es konnte stattdessen gezeigt werden, dass die Permissivität der verwendeten Zelllinien für die Unterschiede bei der Effizienz der viralen Replikation des ONYX-015 verantwortlich ist (Goodrum und Ornelles, 1998; Rothmann *et al.*, 1998; Harada und Berk, 1999; Steegenga *et al.*, 1999; Turnell *et al.*, 1999). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Lyse der infizierten Zellen nicht von der Anwesenheit des Tumorsuppressorproteins p53 (Rothmann *et al.*, 1998), sondern ebenfalls von der Permissivität der Zelllinie gegenüber Virusreplikation abhängig ist (Steegenga *et al.*, 1999). Obwohl die molekulare Grundlage für die tumorspezifische Replikation von ONYX-015 noch unklar ist und kontrovers diskutiert wird (zur Übersicht: Dix *et al.*, 2001), stellt diese E1B-attenuierte Virusmutante ein neues vielversprechendes Konzept zur Behandlung von Tumorerkrankungen dar (zur Übersicht: Alemany *et al.*, 2000). Klinische Versuche der Phase I und II weisen darauf hin, dass ONYX-015 in Verbindung mit Chemotherapie tatsächlich Tumorzellen zerstören kann ohne das umgebende gesunde Gewebe zu beeinflussen (Kirn *et al.*, 1998; Heise *et al.*, 1999; Heise *et al.*, 2000; Khuri *et al.*, 2000; Nemunaitis *et al.*, 2000).

In diesem Zusammenhang wäre die weitere Analyse der Ringfinger-Mutanten RF-1 und RF-6 von großem Interesse, da hier offensichtlich ein p53-unabhängiger Mechanismus vorliegt. Darüber hinaus stellen die Doppelmутanten (E1B und E4orf3, E1B und E4orf6) weitere potenzielle Kombinationen für präklinische Studien dar, da durch diese Veränderungen ihre Replikation auf bestimmte Tumortypen beschränkt werden kann.

7 Literaturverzeichnis

- Alemaný, R., Balague, C., und Curiel, D.T.** (2000). Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biotechnol* **18**, 723-727.
- Anderson, C.W., Baum, P.R., und Gesteland, R.F.** (1973). Processing of adenovirus 2-induced proteins. *J Virol* **12**, 241-252.
- Ankerst, J., und Jonsson, N.** (1989). Adenovirus type 9-induced tumorigenesis in the rat mammary gland related to sex hormonal state. *J Natl Cancer Inst* **81**, 294-298.
- Ankerst, J., Steele, G., Jr., und Sjogren, H.O.** (1974a). Cross-reacting tumor-associated antigen(s) of adenovirus type 9-induced fibroadenomas and a chemically induced mammary carcinoma in rats. *Cancer Res* **34**, 1794-1800.
- Ankerst, J., Jonsson, N., Kjellen, L., Norrby, E., und Sjogren, H.O.** (1974b). Induction of mammary fibroadenomas in rats by adenovirus type 9. *Int. J. Cancer* **13**, 286-290.
- Babich, A., Feldman, L.T., Nevins, J.R., Darnell, J.E., Jr., und Weinberger, C.** (1983). Effect of adenovirus on metabolism of specific host mRNAs: transport control and specific translational discrimination. *Mol Cell Biol* **3**, 1212-1221.
- Babiss, L.E., und Ginsberg, H.S.** (1984). Adenovirus type 5 early region 1b gene product is required for efficient shutoff of host protein synthesis. *J Virol* **50**, 202-212.
- Babiss, L.E., Ginsberg, H.S., und Darnell, J.E., Jr.** (1985). Adenovirus E1B proteins are required for accumulation of late viral mRNA and for effects on cellular mRNA translation and transport. *Mol Cell Biol* **5**, 2552-2558.
- Bachi, A., Braun, I.C., Rodrigues, J.P., Pante, N., Ribbeck, K., von Kobbe, C., Kutay, U., Wilm, M., Gorlich, D., Carmo-Fonseca, M., und Izaurralde, E.** (2000). The C-terminal domain of TAP interacts with the nuclear pore complex and promotes export of specific CTE-bearing RNA substrates. *Rna* **6**, 136-158.
- Barker, D.D., und Berk, A.J.** (1987). Adenovirus proteins from both E1B reading frames are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection. *Virology* **156**, 107-121.
- Beck, K.F., Stathopoulos, I., Berninger, M.G., und Schweizer, M.** (1993). Overcoming GC compression in nucleotide sequencing. *Biotechniques* **14**, 375.
- Beltz, G.A., und Flint, S.J.** (1979). Inhibition of HeLa cell protein synthesis during adenovirus infection. Restriction of cellular messenger RNA sequences to the nucleus. *J Mol Biol* **131**, 353-373.
- Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L., und Finberg, R.W.** (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**, 1320-1323.

- Bernards, R., und van der Eb, A.J.** (1984). Adenovirus: Transformation and Oncogenicity. *Biochim. Biophys. Acta* **783**, 187-204.
- Bernards, R., Vaessen, M.J., Van der Eb, A.J., und Sussenbach, J.S.** (1983). Construction and characterization of an adenovirus type 5/adenovirus type 12 recombinant virus. *Virology* **131**, 30-38.
- Bischoff, J.R., Kirn, D.H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J.A., Sampson Johannes, A., Fattaey, A., und McCormick, F.** (1996). An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells [see comments]. *Science* **274**, 373-376.
- Blair Zajdel, M.E., und Blair, G.E.** (1988). The intracellular distribution of the transformation-associated protein p53 in adenovirus-transformed rodent cells. *Oncogene* **2**, 579-584.
- Borden, K.L.** (2000). RING Domains: Master Builders of Molecular Scaffolds? *J Mol Biol* **295**, 1103-1112.
- Boyer, J., Rohleder, K., und Ketner, G.** (1999). Adenovirus E4 34k and E4 11k inhibit double strand break repair and are physically associated with the cellular DNA-dependent protein kinase. *Virology* **263**, 307-312.
- Boyer, J.L., und Ketner, G.** (2000). Genetic analysis of a potential zinc-binding domain of the adenovirus E4 34k protein. *J Biol Chem* **275**, 14969-14978.
- Boyle, J.S., und Lew, A.M.** (1995). An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends Genet* **11**, 8.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Bridge, E., und Ketner, G.** (1989). Redundant control of adenovirus late gene expression by early region 4. *J Virol* **63**, 631-638.
- Bridge, E., und Ketner, G.** (1990). Interaction of adenoviral E4 and E1b products in late gene expression. *Virology* **174**, 345-353.
- Brusca, J.S., Jannun, R., und Chinnadurai, G.** (1984). Efficient transformation of rat 3Y1 cells by human adenovirus type 9. *Virology* **136**, 328-337.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M., und Short, J.M.** (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with b-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**, 376-379.
- Burgert, H.G., und Blusch, J.H.** (2000). Immunomodulatory functions encoded by the E3 transcription unit of adenoviruses. *Virus Genes* **21**, 13-25.

- Byrd, P., Brown, K.W., und Gallimore, P.H.** (1982). Malignant transformation of human embryo retinoblasts by cloned adenovirus 12 DNA. *Nature* **298**, 69-671.
- Carney, J.P., Maser, R.S., Olivares, H., Davis, E.M., Le Beau, M., Yates, J.R.r., Hays, L., Morgan, W.F., und Petrini, J.H.** (1998). The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* **93**, 477-486.
- Cathomen, T., und Weitzman, M.D.** (2000). A functional complex of adenovirus proteins E1B-55kDa and e4orf6 is necessary To modulate the expression level of p53 but not its transcriptional activity. *J Virol* **74**, 11407-11412.
- Chartier, C., Degryse, E., Gantzer, M., Dieterle, A., Pavirani, A., und Mehtali, M.** (1996). Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J Virol* **70**, 4805-4810.
- Chauvin, C., Suh, M., Remy, C., und Benabid, A.L.** (1990). Failure to detect viral genomic sequences of three viruses (herpes simplex, simian virus 40 and adenovirus) in human and rat brain tumors. *Ital J Neurol Sci* **11**, 347-357.
- Chinnadurai, G.** (1998). Control of apoptosis by human adenovirus genes. *Semin Virol* **8**, 399-408.
- Cockman, M.E., Masson, N., Mole, D.R., P., J., Chang, G.-W., Clifford, S.C., Maher, E.R., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., und Maxwell, P.H.** (2000). Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* **275**, 25733-25741.
- Cook, J.L., und Lewis, A.M., Jr.** (1987). Immunological surveillance against DNA-virus-transformed cells: correlations between natural killer cell cytolytic competence and tumor susceptibility of athymic rodents. *J Virol* **61**, 2155-2161.
- Cutt, J.R., Shenk, T., und Hearing, P.** (1987). Analysis of adenovirus early region 4-encoded polypeptides synthesized in productively infected cells. *J Virol* **61**, 543-552.
- Davison, A.J., Benko, M., und Harrach, B.** (2003). Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol* **84**, 2895-2908.
- Debbas, M., und White, E.** (1993). Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes Dev* **7**, 546-554.
- Denome, R.M., Werner, E.A., und Patterson, R.J.** (1989). RNA metabolism in nuclei: adenovirus and heat shock alter intranuclear RNA compartmentalization. *Nucleic Acids Res* **17**, 2081-2098.
- Devereux, J., Haeberli, P., und Smithies, O.** (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* **12**, 387-395.

- Dix, B.R., Edwards, S.J., und Braithwaite, A.W.** (2001). Does the antitumor adenovirus ONYX-015/dl1520 selectively target cells defective in the p53 pathway? *J Virol* **75**, 5443-5447.
- Dobbelstein, M., Roth, J., Kimberly, W.T., Levine, A.J., und Shenk, T.** (1997). Nuclear export of the E1B 55-kDa and E4 34-kDa adenoviral oncoproteins mediated by a rev-like signal sequence. *Embo J* **16**, 4276-4284.
- Dobner, T., und Kzhyshkowska, J.** (2001). Nuclear export of adenovirus RNA. *Curr Top Microbiol Immunol* **259**, 25-54.
- Dobner, T., Horikoshi, N., Rubenwolf, S., und Shenk, T.** (1996). Blockage by adenovirus E4orf6 of transcriptional activation by the p53 tumor suppressor. *Science* **272**, 1470-1473.
- Dolph, P.J., Huang, J.T., und Schneider, R.J.** (1990). Translation by the adenovirus tripartite leader: elements which determine independence from cap-binding protein complex [published erratum appears in *J Virol* 1990 Aug;64(8):4042]. *J Virol* **64**, 2669-2677.
- Dolph, P.J., Racaniello, V., Villamarin, A., Palladino, F., und Schneider, R.J.** (1988). The adenovirus tripartite leader may eliminate the requirement for cap-binding protein complex during translation initiation. *J Virol* **62**, 2059-2066.
- Dosch, T., Horn, F., Schneider, G., Krätzer, F., Dobner, T., Hauber, J., und Stauber, R.H.** (2001). The adenovirus type 5 E1B-55K oncoprotein actively shuttles in virus-infected cells, whereas transport of E4orf6 is mediated by a CRM1-independent mechanism. *J Virol* **75**, 5677-5683.
- Duan, D.R., Pause, A., Burgess, W.H., Aso, T., Chen, D.Y., Garrett, K.P., Conaway, R.W., Conaway, J.W., Linehan, W.M., und Klausner, R.D.** (1995). Inhibition of transcriptional elongation by the VHL tumor suppressor protein. *Science* **269**, 1402-1406.
- Dulbecco, R., und Freeman, G.** (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology* **8**, 396-397.
- Enders, J.F., Bell, J.A., und Dingle, J.H.** (1956). "Adenoviruses": group name proposed for new respiratory-tract viruses[^]. *Science* **124**, 119-120.
- Endter, C.** (2002). Identifizierung regulatorischer Bereiche im E1B-55kDa-Protein von Adenovirus Serotyp 5 und ihre Rolle bei der Transformation (Dissertation. Universität Regensburg).
- Endter, C., Kzhyshkowska, J., Stauber, R.H., und Dobner, T.** (2001). Sumo-1 modification required for transformation by adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11312-11317.
- Fallaux, F.J., Kranenburg, O., Cramer, S.J., Houweling, A., Van Ormondt, H., Hoeben, R.C., und Van Der Eb, A.J.** (1996). Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* **7**, 215-222.

- Fallaux, F.J., Bout, A., van der Velde, I., van den Wollenberg, D.J., Hehir, K.M., Keegan, J., Auger, C., Cramer, S.J., van Ormondt, H., van der Eb, A.J., Valerio, D., und Hoebe, R.C.** (1998). New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther* **9**, 1909-1917.
- Farmer, G., Bargonetti, J., Zhu, H., Friedman, P., Prywes, R., und Prives, C.** (1992). Wild-type p53 activates transcription in vitro. *Nature* **358**, 83-86.
- Freedman, D.A., und Levine, A.J.** (1998). Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. *Mol Cell Biol* **18**, 7288-7293.
- Gabler, S., Schütt, H., Groitl, P., Wolf, H., Shenk, T., und Dobner, T.** (1998). E1B 55-kilodalton-associated protein: a cellular protein with RNA-binding activity implicated in nucleocytoplasmic transport of adenovirus and cellular mRNAs. *J Virol* **72**, 7960-7971.
- Gallimore, P.H., und Turnell, A.S.** (2001). Adenovirus E1A: remodelling the host cell, a life or death experience. *Oncogene* **20**, 7824-7835.
- Gallimore, P.H., Grand, R.J., und Byrd, P.J.** (1986). Transformation of human embryo retinoblasts with simian virus 40, adenovirus and ras oncogenes. *Anticancer Res* **6**, 499-508.
- Gallimore, P.H., Byrd, P.J., Whittaker, J.L., und Grand, R.J.** (1985). Properties of rat cells transformed by DNA plasmids containing adenovirus type 12 E1 DNA or specific fragments of the E1 region: comparison of transforming frequencies. *Cancer Res* **45**, 2670-2680.
- Gallimore, P.H., Byrd, P.J., Grand, R.J., Whitaker, J.L., Breiding, D., und Williams, J.** (1984). An examination of the transforming and tumor-inducing capacity of a number of adenovirus type 12 early region 1, hostrange mutants and cells transformed by subgenomic fragments of Ad12 E1 region. *Cancer Cells* **2**, 519-526.
- Gaynor, R.B., Hillman, D., und Berk, A.J.** (1984). Adenovirus early region 1A protein activates transcription of a nonviral gene introduced into mammalian cells by infection or transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1193-1197.
- Gey, G.O., Coffman, W.D., und Kubicek, M.T.** (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res* **12**, 264-265.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., und Parks, W.P.** (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* **51**, 1417-1423.
- Ginsberg, D., Mehta, F., Yaniv, M., und Oren, M.** (1991). Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters. *Proc Natl Acad Sci* **88**, 9979-9983.
- Gonzalez, R.A., und Flint, S.J.** (2002). Effects of mutations in the adenoviral E1B 55-kilodalton protein coding sequence on viral late mRNA metabolism. *J Virol* **76**, 4507-4519.

- Gooding, L.R., und Wold, W.S.** (1990). Molecular mechanisms by which adenoviruses counteract antiviral immune defenses. *Crit. Rev. Immunol.* **10**, 53-71.
- Goodrum, F.D., und Ornelles, D.A.** (1997). The early region 1B 55-kilodalton oncoprotein of adenovirus relieves growth restrictions imposed on viral replication by the cell cycle. *J Virol* **71**, 548-561.
- Goodrum, F.D., und Ornelles, D.A.** (1998). p53 status does not determine outcome of E1B 55-kilodalton mutant adenovirus lytic infection. *J Virol* **72**, 9479-9490.
- Goodrum, F.D., Shenk, T., und Ornelles, D.A.** (1996). Adenovirus early region 4 34-kilodalton protein directs the nuclear localization of the early region 1B 55-kilodalton protein in primate cells. *J Virol* **70**, 6323-6335.
- Graham, F.L.** (1984). Transformation by and oncogenicity of human adenoviruses. In *The adenoviruses*, H.S. Ginsberg, ed (New York: Plenum Press), pp. 339-398.
- Graham, F.L., und van der Eb, A.J.** (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**, 456-467.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., und Nairn, R.** (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**, 59-74.
- Grand, R.J., und Gallimore, P.H.** (1984). Adenovirus type 12 early region 1 proteins: a study of their subcellular localization and protein-protein interactions. *J Gen Virol* **65**, 2149-2166.
- Grand, R.J., Grant, M.L., und Gallimore, P.H.** (1994). Enhanced expression of p53 in human cells infected with mutant adenoviruses. *Virology* **203**, 229-240.
- Greener, A.** (1990). *Strategies* **3**, 5-6.
- Greener, A., und Jerpseth, B.** (1993). *Strategies* **6**, 57.
- Haber, J.E.** (1998). The many interfaces of Mre11. *Cell* **95**, 583-586.
- Halbert, D.N., Cutt, J.R., und Shenk, T.** (1985). Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff. *J Virol* **56**, 250-257.
- Haley, K.P., Overhauser, J., Babiss, L.E., Ginsberg, H.S., und Jones, N.C.** (1984). Transformation properties of type 5 adenovirus mutants that differentially express the E1A gene products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 5734-5738.
- Hall, T.A.** (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**, 95-98.

- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Harada, J.N., und Berk, A.J.** (1999). p53-Independent and -dependent requirements for E1B-55K in adenovirus type 5 replication. *J Virol* **73**, 5333-5344.
- Harada, J.N., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Pallas, D.C., und Berk, A.J.** (2002). Analysis of the adenovirus E1B-55K-anchored proteome reveals its link to ubiquitination machinery. *J Virol* **76**, 9194-9206.
- Harlow, E., und Lane, D.P.** (1988). *Antibodies, a laboratory manual.* (Cold Spring Harbor).
- Harlow, E., Franza, B.R., Jr., und Schley, C.** (1985). Monoclonal antibodies specific for adenovirus early region 1A proteins: extensive heterogeneity in early region 1A products. *J Virol* **55**, 533-546.
- Hayflick, L.** (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **37**, 614-636.
- He, T.C., Zhou, S., da Costa, L.T., Yu, J., Kinzler, K.W., und Vogelstein, B.** (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2509-2514.
- Hearing, P., und Shenk, T.** (1985). Sequence-independent autoregulation of the adenovirus type 5 E1A transcription unit. *Mol Cell Biol* **5**, 3214-3221.
- Heise, C., Ganly, I., Kim, Y.T., Sampson-Johannes, A., Brown, R., und Kirn, D.** (2000). Efficacy of a replication-selective adenovirus against ovarian carcinomatosis is dependent on tumor burden, viral replication and p53 status.[In Process Citation]. *Gene Ther* **7**, 1925-1929.
- Heise, C.C., Williams, A.M., Xue, S., Propst, M., und Kirn, D.H.** (1999). Intravenous administration of ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, induces antitumoral efficacy. *Cancer Res* **59**, 2623-2628.
- Hilleman, M.R., und Werner, J.H.** (1954). Recovery of new agents from patients with acute respiratory illness. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **85**, 183-188.
- Horwitz, M.S.** (1996). Adenoviruses. Third ed. In "Virology". In *Virology*, Third ed., B.N. Fields, D.M. Knipe, und P.M. Howley, eds (Lippincott-Raven, New York), pp. 2149-2171.
- Horwitz, M.S.** (2001). Adenovirus immunoregulatory genes and their cellular targets. *Virology* **279**, 1-8.
- Houweling, A., van den Elsen, P.J., und van der Eb, A.J.** (1980). Partial transformation of primary rat cells by the leftmost 4.5% fragment of adenovirus 5 DNA. *Virology* **105**, 537-550.
- Huang, J.T., und Schneider, R.J.** (1990). Adenovirus inhibition of cellular protein synthesis is prevented by the drug 2-aminopurine. *Proc Natl Acad Sci* **87**, 7115-7119.

- Huang, M.M., und Hearing, P.** (1989). Adenovirus early region 4 encodes two gene products with redundant effects in lytic infection. *J Virol* **63**, 2605-2615.
- Huang, W., und Flint, S.J.** (1998). The tripartite leader sequence of subgroup C adenovirus major late mRNAs can increase the efficiency of mRNA export. *J Virol* **72**, 225-235.
- Huebner, R.J., Rowe, W.P., Ward, T.G., Parrot, R.H., und Bell, J.A.** (1954). Adenoidal-pharyngeal conjunctival agents. *N. Engl. J. Med.* **251**, 1077-1086.
- Hutton, F.G., Turnell, A.S., Gallimore, P.H., und Grand, R.J.** (2000). Consequences of disruption of the interaction between p53 and the larger adenovirus early region 1B protein in adenovirus E1 transformed human cells. *Oncogene* **19**, 452-462.
- Imler, J.L., Chartier, C., Dreyer, D., Dieterle, A., Sainte Marie, M., Faure, T., Pavirani, A., und Mehtali, M.** (1996). Novel complementation cell lines derived from human lung carcinoma A549 cells support the growth of E1-deleted adenovirus vectors. *Gene Ther* **3**, 75-84.
- Izaurrealde, E., und Mattaj, I.W.** (1995). RNA export. *Cell* **81**, 153-159.
- Jackson, P.K., Eldridge, A.G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J.Y., Kaiser, B.K., und Reimann, J.D.** (2000). The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *trends in Cell Biology* **10**, 429-439.
- Jakoby, W.B., und Pastan, I.H.** (1979). *Cell culture. Methods in enzymologie.* (San Diego, Carlifornia: Academic press, Inc.).
- Javier, R., Raska, K., Jr., und Shenk, T.** (1992). Requirement for the adenovirus type 9 E4 region in production of mammary tumors. *Science* **257**, 1267-1271.
- Javier, R., Raska, K., Jr., Macdonald, G.J., und Shenk, T.** (1991). Human adenovirus type 9-induced rat mammary tumors. *J Virol* **65**, 3192-3202.
- Jin, S., und Levine, A.J.** (2001). The p53 functional circuit. *J Cell Sci* **114**, 4139-4140.
- Jones, N., und Shenk, T.** (1979). Isolation of adenovirus type 5 host range deletion mutants defective for transformation of rat embryo cells. *Cell* **17**, 683-689.
- Jonsson, N., und Ankerst, J.** (1977). Studies on adenovirus type 9-induced mammary fibroadenomas in rats and their malignant transformation. *Cancer* **39**, 2513-2519.
- Kamura, T., Sato, S., Iwai, K., Czyzyk-Krzeska, M., Conaway, R.W., und Conaway, J.W.** (2000). Activation of HIF1 α ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc Natl Acad Sci* **97**, 10430-10435.
- Kamura, T., Sato, S., Haque, D., Liu, L., Kaelin, W.G., Conaway, R.W., und Conaway, J.W.** (1998). The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families. *Genes Dev* **12**, 3872-3881.

- Kao, C.C., Yew, P.R., und Berk, A.J.** (1990). Domains required for in vitro association between the cellular p53 and the adenovirus 2 E1B 55K proteins. *Virology* **179**, 806-814.
- Khuri, F.R., Nemunaitis, J., Ganly, I., Arseneau, J., Tannock, I.F., Romel, L., Gore, M., Ironside, J., MacDougall, R.H., Heise, C., Randlev, B., Gillenwater, A.M., Bruso, P., Kaye, S.B., Hong, W.K., und Kirn, D.H.** (2000). a controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer [see comments]. *Nat Med* **6**, 879-885.
- Kibel, A., Iliopoulos, O., DeCaprio, J.A., und Kaelin, W.G.** (1995). Binding of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein to Elongin B and C. *Science* **269**, 1444-1446.
- Kindsmüller, K.** (2002). Molekularbiologische Charakterisierung von Mutanten des Adenovirus Typ5 E1B-55kDa-Proteins (Regensburg: Universität Regensburg).
- Kirn, D., Hermiston, T., und McCormick, F.** (1998). ONYX-015: clinical data are encouraging [letter]. *Nat Med* **4**, 1341-1342.
- König, C., Roth, J., und Dobbelstein, M.** (1999). Adenovirus type 5 E4orf3 protein relieves p53 inhibition by E1B-55-kilodalton protein. *J Virol* **73**, 2253-2262.
- Krätzer, F., Rosorius, O., Heger, P., Hirschmann, N., Dobner, T., Hauber, J., und Stauber, R.H.** (2000). The adenovirus type 5 E1B-55K oncoprotein is a highly active shuttle protein and shuttling is independent of E4orf6, p53 and Mdm2. *Oncogene* **19**, 850-857.
- Kuhlmann, I., Achten, S., Rudolph, R., und Dörfler, W.** (1982). Tumor induction by human adenovirus type 12 in hamsters: loss of the viral genome from adenovirus type 12-induced tumor cells is compatible with tumor formation. *EMBO J.* **1**, 79-86.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Leppard, K.N.** (1993). Selective effects on adenovirus late gene expression of deleting the E1b 55K protein. *J Gen Virol* **74**, 575-582.
- Leppard, K.N., und Shenk, T.** (1989). The adenovirus E1B 55 kd protein influences mRNA transport via an intranuclear effect on RNA metabolism. *Embo J* **8**, 2329-2336.
- Leppard, K.N., und Everett, R.D.** (1999). The adenovirus type 5 E1b 55K and E4 Orf3 proteins associate in infected cells and affect ND10 components. *J Gen Virol* **80**, 997-1008.
- Levine, A.J.** (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and deviation. *Cell* **88**, 323-331.
- Logan, J., und Shenk, T.** (1984). Adenovirus tripartite leader sequence enhances translation of mRNAs late after infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 3655-3659.

- Lowe, S.W., und Ruley, H.E.** (1993). Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes Dev* **7**, 535-545.
- Lu, H., und Levine, A.J.** (1995). Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc Natl Acad Sci* **92**, 5154-5158.
- Mackey, J.K., Rigden, P.M., und Green, M.** (1976). Do highly oncogenic group A human adenoviruses cause human cancer? Analysis of human tumors for adenovirus 12 transforming DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 4657-4661.
- Mackey, J.K., Green, M., Wold, W.S., und Rigden, P.** (1979). Analysis of human cancer DNA for DNA sequences of human adenovirus type 4. *J Natl Cancer Inst* **62**, 23-26.
- Marcellus, R.C., Teodoro, J.G., Wu, T., Brough, D.E., Ketner, G., Shore, G.C., und Branton, P.E.** (1996). Adenovirus type 5 early region 4 is responsible for E1A-induced p53-independent apoptosis. *J Virol* **70**, 6207-6215.
- Martin, M.E., und Berk, A.J.** (1998). Adenovirus E1B 55K represses p53 activation in vitro. *J. Virol.* **72**, 3146-3154.
- Marton, M.J., Baim, S.B., Ornelles, D.A., und Shenk, T.** (1990). The adenovirus E4 17-kilodalton protein complexes with the cellular transcription factor E2F, altering its DNA-binding properties and stimulating E1A-independent accumulation of E2 mRNA. *J Virol* **64**, 2345-2359.
- Mathews, M.B., und Shenk, T.** (1991). Adenovirus virus-associated RNA and translation control. *J Virol* **65**, 5657-5662.
- Maxwell, P.H., Wiesner, M.S., Chang, G.-W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R., und Ratcliffe, P.J.** (1999). The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **399**, 271-275.
- McLorie, W., McGlade, C.J., Takayasu, D., und Branton, P.E.** (1991). Individual adenovirus E1B proteins induce transformation independently but by additive pathways. *J Gen Virol* **72**, 1467-1471.
- Melchior, F.** (2000). SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 591-626.
- Mitsudomi, T., Steinberg, S.M., Nau, M.M., Carbone, D., D'Amico, D., Bodner, S., Oie, H.K., Linnoila, R.I., Mulshine, J.L., Minna, J.D., und al., e.** (1992). p53 gene mutations in non-small-cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene* **7**, 171-180.
- Modrow, S., und Falke, D.** (1997). *Molekulare Virologie*. (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH).
- Moore, M., Horikoshi, N., und Shenk, T.** (1996). Oncogenic potential of the adenovirus E4orf6 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11295-11301.

- Moore, M., Schaack, J., Baim, S.B., Morimoto, R.I., und Shenk, T.** (1987). Induced heat shock mRNAs escape the nucleocytoplasmic transport block in adenovirus-infected HeLa cells. *Mol Cell Biol* **7**, 4505-4512.
- Moran, E.** (1994). Mammalian cell growth controls reflected through protein interactions with the adenovirus E1A gene products. *Semin Virol* **5**, 327-340.
- Moran, E., Grodzicker, T., Roberts, R.J., Mathews, M.B., und Zerler, B.** (1986). Lytic and transforming functions of individual products of the adenovirus E1A gene. *J Virol* **57**, 765-775.
- Muller, S., Hoege, C., Pyrowolakis, G., und Jentsch, S.** (2001). SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 202-210.
- Nemunaitis, J., Ganly, I., Khuri, F., Arseneau, J., Kuhn, J., McCarty, T., Landers, S., Maples, P., Romel, L., Randlev, B., Reid, T., Kaye, S., und Kirn, D.** (2000). Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial [In Process Citation]. *Cancer Res* **60**, 6359-6366.
- Nevels, M., Spruss, T., Wolf, H., und Dobner, T.** (1999a). The adenovirus E4orf6 protein contributes to malignant transformation by antagonizing E1A-induced accumulation of the tumor suppressor protein p53. *Oncogene* **18**, 9-17.
- Nevels, M., Rubenwolf, S., Spruss, T., Wolf, H., und Dobner, T.** (1997). The adenovirus E4orf6 protein can promote E1A/E1B-induced focus formation by interfering with p53 tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1206-1211.
- Nevels, M., Rubenwolf, S., Spruss, T., Wolf, H., und Dobner, T.** (2000). Two distinct activities contribute to the oncogenic potential of the adenovirus type 5 E4orf6 protein. *J Virol* **74**, 5168-5181.
- Nevels, M., Täuber, B., Kremmer, E., Spruss, T., Wolf, H., und Dobner, T.** (1999b). Transforming potential of the adenovirus type 5 E4orf3 protein. *J Virol* **73**, 1591-1600.
- Nicolas, A.L., Munz, P.L., Falck Pedersen, E., und Young, C.S.** (2000). Creation and repair of specific DNA double-strand breaks in vivo following infection with adenovirus vectors expressing *Saccharomyces cerevisiae* HO endonuclease. *Virology* **266**, 211-224.
- Ohh, M., Park, C.W., Ivan, M., Hoffman, M.A., Kim, T.-Y., Huang, L.E., Pavletich, N., Chau, V., und Kaelin, W.G.** (2000). Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding of the β -domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol* **2**, 423-427.
- Orlando, J.S., und Ornelles, D.A.** (1999). An arginine-faced amphipathic alpha helix is required for adenovirus type 5 e4orf6 protein function. *J Virol* **73**, 4600-4610.
- Ornelles, D.A., und Shenk, T.** (1991). Localization of the adenovirus early region 1B 55-kilodalton protein during lytic infection: association with nuclear viral inclusions requires the early region 4 34-kilodalton protein. *J Virol* **65**, 424-429.

- Paraskeva, C., und Gallimore, P.H.** (1980). Tumorigenicity and in vitro characteristics of rat liver epithelial cells and their adenovirus-transformed derivatives. *Int J Cancer* **25**, 631-639.
- Paraskeva, C., Brown, K.W., Dunn, A.R., und Gallimore, P.H.** (1982). Adenovirus type 12-transformed rat embryo brain and rat liver epithelial cell lines: adenovirus type 12 genome content and viral protein expression. *J Virol* **44**, 759-764.
- Petrini, J.H.** (1999). The mammalian Mre11-Rad50-nbs1 protein complex: integration of functions in the cellular DNA-damage response. *Am J Hum Genet* **64**, 1264-1269.
- Pfeffer, A., Schubbert, R., Orend, G., Hilger Eversheim, K., und Dörfler, W.** (1999). Integrated viral genomes can be lost from adenovirus type 12-induced hamster tumor cells in a clone-specific, multistep process with retention of the oncogenic phenotype. *Virus Res* **59**, 113-127.
- Pichler, A., und Melchior, F.** (2002). Ubiquitin-related modifier SUMO1 and nucleocytoplasmic transport. *Traffic* **3**, 381-387.
- Pilder, S., Moore, M., Logan, J., und Shenk, T.** (1986). The adenovirus E1B-55K transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilization of viral and host cell mRNAs. *Mol Cell Biol* **6**, 470-476.
- Punga, T., und Akusjarvi, G.** (2000). The adenovirus-2 E1B-55K protein interacts with a mSin3A/histone deacetylase 1 complex. *FEBS Lett* **476**, 248-252.
- Querido, E., Marcellus, R.C., Lai, A., Charbonneau, R., Teodoro, J.G., Ketner, G., und Branton, P.E.** (1997). Regulation of p53 levels by the E1B 55-kilodalton protein and E4orf6 in adenovirus-infected cells. *J Virol* **71**, 3788-3798.
- Querido, E., Morrison, M.R., Chu-Pham-Dang, H., Thirlwell, S.W., Boivin, D., Branton, P.E., und Morisson, M.R.** (2001a). Identification of three functions of the adenovirus e4orf6 protein that mediate p53 degradation by the E4orf6-E1B55K complex. *J Virol* **75**, 699-709.
- Querido, E., Blanchette, P., Yan, Q., Kammura, T., Morrison, M., Boivin, D., Kaelin, W.G., Conaway, R.C., Conaway, J.W., und Branton, P.E.** (2001b). Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. *Genes Dev* **15**, 3104-3117.
- Raska, K., Jr., und Gallimore, P.H.** (1982). An inverse relation of the oncogenic potential of adenovirus-transformed cells and their sensitivity to killing by syngeneic natural killer cells. *Virology* **123**, 8-18.
- Reich, N.C., Sarnow, P., Duprey, E., und Levine, A.J.** (1983). Monoclonal antibodies which recognize native and denatured forms of the adenovirus DNA-binding protein. *Virology* **128**, 480-484.
- Reines, D., Conaway, R.W., und Conaway, J.W.** (1999). Mechanism and regulation of transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 342-346.

- Ridgway, P.J., Hall, A.R., Myers, C.J., und Braithwaite, A.W.** (1997). p53/E1b58kDa complex regulates adenovirus replication. *Virology* **237**, 404-413.
- Ries, S.J., Brandts, C.H., Chung, A.S., Biederer, C.H., Hann, B.C., Lipner, E.M., McCormick, F., und Michael Korn, W.** (2000). Loss of p14ARF in tumor cells facilitates replication of the adenovirus mutant dl1520 (ONYX-015) [In Process Citation]. *Nat Med* **6**, 1128-1133.
- Roth, J., König, C., Wienzek, S., Weigel, S., Ristea, S., und Döbelstein, M.** (1998). Inactivation of p53 but not p73 by adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton and E4 34-kilodalton oncoproteins. *J Virol* **72**, 8510-8516.
- Rothmann, T., Hengstermann, A., Whitaker, N.J., Scheffner, M., und zur Hausen, H.** (1998). Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *J Virol* **72**, 9470-9478.
- Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parrot, R.H., und Ward, T.G.** (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **84**, 570-573.
- Rubenwolf, S., Schütt, H., Nevels, M., Wolf, H., und Dobner, T.** (1997). Structural analysis of the adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton-E4orf6 protein complex. *J Virol* **71**, 1115-1123.
- Ruley, H.E.** (1983). Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* **304**, 602-606.
- Russell, W.C.** (2000). Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* **81**, 2573-2604.
- Ryan, K.M., Phillips, A.C., und Vousden, K.H.** (2001). Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 332-337.
- Sabbatini, P., Chiou, S.K., Rao, L., und White, E.** (1995). Modulation of p53-mediated transcriptional repression and apoptosis by the adenovirus E1B 19K protein. *Mol Cell Biol* **15**, 1060-1070.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., und Erlich, H.A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sandler, A.B., und Ketner, G.** (1989). Adenovirus early region 4 is essential for normal stability of late nuclear RNAs. *J Virol* **63**, 624-630.
- Sandler, A.B., und Ketner, G.** (1991). The metabolism of host RNAs in cells infected by an adenovirus E4 mutant. *Virology* **181**, 319-326.

- Sarnow, P., Ho, Y.S., Williams, J., und Levine, A.J.** (1982a). Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. *Cell* **28**, 387-394.
- Sarnow, P., Hearing, P., Anderson, C.W., Reich, N., und Levine, A.J.** (1982b). Identification and characterization of an immunologically conserved adenovirus early region 11,000 Mr protein and its association with the nuclear matrix. *J. Mol. Biol.* **162**, 565-583.
- Sarnow, P., Hearing, P., Anderson, C.W., Halbert, D.N., Shenk, T., und Levine, A.J.** (1984). Adenovirus early region 1B 58,000-dalton tumor antigen is physically associated with an early region 4 25,000-dalton protein in productively infected cells. *J Virol* **49**, 692-700.
- Saurin, A.J., Borden, K.L., Boddy, M.N., und Freemont, P.S.** (1996). Does this have a familiar RING? *TIBS* **21**, 208-214.
- Schiedner, G., Hertel, S., und Kochanek, S.** (2000). Efficient transformation of primary human amniocytes by E1 functions of ad5: generation of new cell lines for adenoviral vector production [In Process Citation]. *Hum Gene Ther* **11**, 2105-2116.
- Schmitt, C.A., und Lowe, S.W.** (2002). Apoptosis and chemoresistance in transgenic cancer models. *J Mol Med* **80**, 137-146.
- Seeler, J.S., Marchio, A., Losson, R., Desterro, J.M., Hay, R.T., Chambon, P., und Dejean, A.** (2001). Common properties of nuclear body protein SP100 and TIF1alpha chromatin factor: role of SUMO modification. *Mol Cell Biol* **21**, 3314-3324.
- Sharma, R.C., und Schimke, R.T.** (1996). Preparation of electrocompetent E. coli using salt-free growth medium. *Biotechniques* **20**, 42-44.
- Shen, Y., Kitzes, G., Nye, J.A., Fattaey, A., und Hermiston, T.** (2001). Analyses of single-amino-acid substitution mutants of adenovirus type 5 E1B-55K protein. *J Virol* **75**, 4297-4307.
- Shenk, T.** (1996). Adenoviridae: the viruses and their replication. In *Virology*, B.N. Fields, D.M. Knipe, und P.M. Howley, eds (New York: Lippincott-Raven), pp. 2111-2148.
- Shepherd, S.E., Howe, J.A., Mymryk, J.S., und Bayley, S.T.** (1993). Induction of the cell cycle in baby rat kidney cells by adenovirus type 5 E1A in the absence of E1B and a possible influence of p53. *J Virol* **67**, 2944-2949.
- Smiley, J.K., Young, M.A., und Flint, S.J.** (1990). Intranuclear location of the adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton protein. *J Virol* **64**, 4558-4564.
- Smiley, J.K., Young, M.A., Bansbach, C.C., und Flint, S.J.** (1995). The metabolism of small cellular RNA species during productive subgroup C adenovirus infection. *Virology* **206**, 100-107.
- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., und Brennan, M.** (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **51**, 1409-1416.

- Stebbins, C.E., Kaelin, W.G., und Pavletich, N.P.** (1999). Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science* **284**, 455-461.
- Steegenga, W.T., Riteco, N., und Bos, J.L.** (1999). Infectivity and expression of the early adenovirus proteins are important regulators of wild-type and DeltaE1B adenovirus replication in human cells. *Oncogene* **18**, 5032-5043.
- Steegenga, W.T., Riteco, N., Jochemsen, A.G., Fallaux, F.J., und Bos, J.L.** (1998). The large E1B protein together with the E4orf6 protein target p53 for active degradation in adenovirus infected cells. *Oncogene* **16**, 349-357.
- Sternsdorf, T., Jensen, K., Reich, B., und Will, H.** (1999). The nuclear dot protein sp100, characterization of domains necessary for dimerization, subcellular localization, and modification by small ubiquitin-like modifiers. *J Biol Chem* **274**, 12555-12566.
- Stracker, T.H., Carson, C.T., und Weitzman, M.D.** (2002). Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11-Rad50-NBS1 DNA repair complex. *Nature* **418**, 348-352.
- Stuurman, N., de Graaf, A., Floore, A., Josso, A., Humbel, B., de Jong, L., und van Driel, R.** (1992). A monoclonal antibody recognizing nuclear matrix-associated nuclear bodies. *J Cell Sci* **101**, 773-784.
- Tao, W., und Levine, A.J.** (1999). Nucleocytoplasmic shuttling of oncoprotein Hdm2 is required for Hdm2-mediated degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci* **96**, 3077-3080.
- Täuber, B.** (1998). Vergleich transformierender Eigenschaften der E4orf3- und E4orf6-Proteine von Adenovirus Typ 5. (Regensburg: Universität Regensburg).
- Täuber, B., und Dobner, T.** (2001a). Molecular regulation and biological function of adenovirus early genes: the E4 ORFs. *Gene* **278**, 1-23.
- Täuber, B., und Dobner, T.** (2001b). Adenovirus early E4 genes in viral oncogenesis. *Oncogene* **20**, 7847-7854.
- Teodoro, J.G., und Branton, P.E.** (1997). Regulation of p53-dependent apoptosis, transcriptional repression, and cell transformation by phosphorylation of the 55-kilodalton E1B protein of human adenovirus type 5. *J Virol* **71**, 3620-3627.
- Teodoro, J.G., Shore, G.C., und Branton, P.E.** (1995). Adenovirus E1A proteins induce apoptosis by both p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Oncogene* **11**, 467-474.
- Thut, C.J., Chen, J.L., Klemm, R., und Tjian, R.** (1995). p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science* **267**, 100-104.
- Tooze, J.** (1981). DNA tumor viruses. In Cold Spring Harbor (Cold Spring Harbor Laboratory, New York), pp. 943-1054.

- Trentin, J.J., Yabe, Y., und Taylor, G.** (1962). The quest for human cancer viruses. *Science* **137**, 835-849.
- Turnell, A.S., Grand, R.J., und Gallimore, P.H.** (1999). The replicative capacities of large E1B-null group A and group C adenoviruses are independent of host cell p53 status. *J Virol* **73**, 2074-2083.
- Turnell, A.S., Grand, R.J., Gorbea, C., Zhang, X., Wang, W., Mymryk, J.S., und Gallimore, P.H.** (2000). Regulation of the 26S proteasome by adenovirus E1A. *Embo J* **19**, 4759-4773.
- van den Heuvel, S.J., The, S.I., Klein, B., Jochemsen, A.G., Zantema, A., und van der Eb, A.J.** (1992). p53 shares an antigenic determinant with proteins of 92 and 150 kilodaltons that may be involved in senescence of human cells. *J Virol* **66**, 591-595.
- van Wilson, G., und Rangasamy, D.** (2001). Intracellular targeting of proteins by sumoylation. *Exp Cell Res* **271**, 57-65.
- Vogelstein, B., Lane, D.P., und Levine, A.J.** (2000). Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307-310.
- Vojtesek, B., Bartek, J., Midgley, C.A., und Lane, D.P.** (1992). An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J Immunol Methods* **151**, 237-244.
- Weiden, M.D., und Ginsberg, H.S.** (1994). Deletion of the E4 region of the genome produces adenovirus DNA concatemers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 153-157.
- Weigel, S., und Dobbelstein, M.** (2000). The nuclear export signal within the E4orf6 protein of adenovirus type 5 supports virus replication and cytoplasmic accumulation of viral mRNA. *J Virol* **74**, 764-772.
- Weinberg, D.H., und Ketner, G.** (1986). Adenoviral early region 4 is required for efficient viral DNA replication and for late gene expression. *J Virol* **57**, 833-838.
- White, E.** (1995). Regulation of p53-dependent apoptosis by E1A and E1B. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199**, 34-58.
- White, E.** (1996). Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev* **10**, 1-15.
- White, E.** (1998). Regulation of apoptosis by adenovirus E1A and E1B oncoproteins. *Semin Virol* **8**, 505-513.
- Whittaker, J.L., Byrd, P.J., Grand, R.J., und Gallimore, P.H.** (1984). Isolation and characterization of four adenovirus type 12-transformed human embryo kidney cell lines. *Mol Cell Biol* **4**, 110-116.
- Wienzek, S., Roth, J., und Dobbelstein, M.** (2000). E1B 55-kilodalton oncoproteins of adenovirus types 5 and 12 inactivate and relocalize p53, but not p51 or p73, and cooperate with E4orf6 proteins to destabilize p53. *J Virol* **74**, 193-202.

- Williams, J., Karger, B.D., Ho, Y.S., Castiglia, C.L., Mann, T., und Flint, S.J.** (1986). The adenovirus E1B 495R protein plays a role in regulating the transport and stability of the viral late messages. *Cancer Cells* **4**, 275-284.
- Wilson, V.G., und Rangasamy, D.** (2001). Intracellular targeting of proteins by sumoylation. *Exp Cell Res* **271**, 57-65.
- Wold, W.S., Mackey, J.K., Rigden, P., und Green, M.** (1979). Analysis of human cancer DNA's for DNA sequence of human adenovirus serotypes 3, 7, 11, 14, 16, and 21 in group B1. *Cancer Res* **39**, 3479-3484.
- Xiao, H., Pearson, A., Coulombe, B., Truant, R., Zhang, S., Regier, J.L., Triezenberg, S.J., Reinberg, D., Flores, O., und Ingles, C.J.** (1994). Binding of basal transcription factor TFIID to the acidic activation domains of VP16 and p53. *Mol Cell Biol* **14**, 7013-7024.
- Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nishikawa, J., Howard, B.H., und Nakatani, Y.** (1996). A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* **382**, 319-324.
- Yew, P.R., und Berk, A.J.** (1992). Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature* **357**, 82-85.
- Yew, P.R., Kao, C.C., und Berk, A.J.** (1990). Dissection of functional domains in the adenovirus 2 early 1B 55K polypeptide by suppressor-linker insertional mutagenesis. *Virology* **179**, 795-805.
- Yew, P.R., Liu, X., und Berk, A.J.** (1994). Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53. *Genes Dev* **8**, 190-202.
- Zantema, A., Fransen, J.A., Davis Olivier, A., Ramaekers, F.C., Vooijs, G.P., DeLeys, B., und Van der Eb, A.J.** (1985). Localization of the E1B proteins of adenovirus 5 in transformed cells, as revealed by interaction with monoclonal antibodies. *Virology* **142**, 44-58.
- Zhang, Y., Feigenblum, D., und Schneider, R.J.** (1994). A late adenovirus factor induces eIF-4E dephosphorylation and inhibition of cell protein synthesis. *J Virol* **68**, 7040-7050.
- Zhu, X.D., Kuster, B., Mann, M., Petrini, J.H., und Lange, T.** (2000). Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat Genet* **25**, 347-352.